

(11) Número de Publicação: **PT 2742017 E**

(51) Classificação Internacional:  
**C07B 59/00** (2015.01)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

---

(22) Data de pedido: **2012.08.10**

(30) Prioridade(s): **2011.08.12 IT FI20110180**

(43) Data de publicação do pedido: **2014.06.18**

(45) Data e BPI da concessão: **2015.10.28**  
**040/2016**

(73) Titular(es):

**ADVANCED ACCELERATOR APPLICATIONS  
S.A.**

**20 RUE RUDOLPH DIESEL 01630 SAINT GENIS  
POUILLY FR**

(72) Inventor(es):

**MARIA AZZURRA FILANNINO  
MAURIZIO FRANCO MARIANI  
LORENZA FUGAZZA**

**IT  
IT  
IT**

(74) Mandatário:

**LUÍSA MARIA FERREIRA GUERREIRO  
RUA RAUL PROENÇA, 3 2820-478 CHARNECA DA  
CAPARICA**

**PT**

(54) Epígrafe: **PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPLEXOS DE 68GA**

(57) Resumo:

UM PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPLEXOS CONTENDO 68GA, EM QUE UM TAMPÃO DE ÁCIDO FÓRMICO/FORMATO NA PRESENÇA DE COMPOSTOS CAPAZES DE SEQUESTRAR CATIÕES DE METAL É UTILIZADO NA REAÇÃO DE COMPLEXAÇÃO.

## **RESUMO**

### **PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPLEXOS DE 68GA**

Um processo para a preparação de complexos contendo 68Ga, em que um tampão de ácido fórmico/formato na presença de compostos capazes de sequestrar catiões de metal é utilizado na reação de complexação.

## **DESCRIÇÃO**

### **PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPLEXOS DE $^{68}\text{GA}$**

#### Campo da invenção

A invenção lida com processos para a preparação de complexos que contêm isótopos, em particular complexos úteis como radio marcadores contendo o isótopo  $^{68}\text{Ga}$ .

#### Estado da técnica

Apesar dos resultados encorajadores dos estudos clínicos recentes que utilizam o radio fármaco  $^{68}\text{Ga}$  marcado para imagiologia PET *in vivo*, a curta semivida do isótopo (68 minutos), que não permite uma distribuição a longo prazo juntamente com a necessidade de uma "produção de radio farmácia" equipada para o processo de marcação proíbe, ainda, a sua utilização generalizada na rotina da medicina nuclear.

A marcação com Ga-68 é levada a cabo por complexação do metal radioativo com um agente quelante adequado num meio de reação, no qual são introduzidas a dose radioativa de  $^{68}\text{Ga}$  que conduz a partir da eluição do gerador de  $^{68}\text{Ga}$ , a quantidade da molécula a ser marcada (referido como molécula funcionalizada por quelante ou precursor no nosso pedido) e um tampão apropriado para assegurar o pH ótimo para a complexação.

O chamado gerador de  $^{68}\text{Ga}$  é uma resina comercialmente disponível, e contendo germânio, partir da qual o desejado  $^{68}\text{Ga}$  é naturalmente formado pela decomposição do germânio; por conseguinte, a eluição da resina, sob as condições de pH adequadas, e na presença de uma molécula quelante funcionalizada permite a formação do complexo desejado contendo  $^{68}\text{Ga}$ ; dependendo da molécula funcionalizada por quelante selecionada, pode ser necessário aquecer 75-90°C.

Os principais limites para o sucesso da marcação são fornecidos pelo facto de que o pH adequado dever ser mantido constante e pela competição das impurezas metálicas com o Ga-68 durante o processo de complexação.

Em vista do acima referido, a pesquisa de um tampão adequado capaz de assegurar um pH normal é, obviamente, um assunto continuamente investigado pelos peritos na marcação de 68Ga e, ainda, em aberto.

Tal tampão deve ser não tóxico, capaz de tamponar na gama de pH de 3,5-5,0, não deve competir com os iões de gálio e, preferencialmente, ter uma fraca capacidade de complexação do metal.

Entre os diferentes tampões relatados, os utilizados principalmente até agora são HEPES (derivado de ácido sulfónico) ou tampões de acetato; no entanto, permitem, apenas, trabalhar num intervalo definido estritamente de pH (Publicação de Velikyan et al., Bioconjugate Chem., 2008, 19, 569-573) e já não podem manter a capacidade do tampão, quando a acidez do eluato necessária varia ligeiramente.

Por exemplo, mesmo um pequeno aumento no volume de fluido proveniente do gerador faz com que o pH volte para valores que danificam a complexação resultando em elevada quantidade de Ga-68 livre. Isso produz um risco de incumprimento que torna a purificação final obrigatória. Além disso, sobre o tampão de HEPES, não há dados toxicológicos disponíveis: a purificação final tem de ser realizada também, a fim de remover, ou pelo menos reduzir, o HEPES antes da administração do radio fármaco. Outros tampões foram recentemente propostos (WO 2010/092114) como solução eficiente para a complexação de Ga-68, por exemplo, tampões de lactato, tartarato e carbonato. Estes tampões

compreendem, pelo menos duas funções de coordenação de Ga-68 que superam o preconceito de que poderiam interferir com a marcação. De qualquer forma, a sua utilização tem sido testada com sucesso com frações reduzidas e purificadas do fluido gerador, sem isentar do tratamento de pré-marcação da solução de Ga-68

Um segundo limite importante é a competição de impurezas metálicas, principalmente catiões trivalentes e bivalentes, derivadas tanto a partir da fase estacionária como do decaimento de Ga-68 (Zn). Estes metais são ligados, bem como, o Ga-68 pela molécula quelante funcionalizada com a redução do número de moléculas efetivamente disponíveis para a marcação. Isto pode resultar numa complexação incompleta do Ga-68 reduzindo a pureza radioquímica final da preparação. Na técnica anterior, por vezes, o Ga-68 não complexado pela molécula funcionalizada por quelante durante a marcação, é completamente sequestrado com a adição de pós-marcação de um excesso de um agente quelante com afinidade reconhecida para o isótopo, (por exemplo, o agente quelante EDTA) a fim de evitar a presença duma porção elevada de metais livres e para promover a sua eliminação no caso da administração da preparação do radio fármaco (WO 2010/141833 - Exemplo 2). Uma complexação parcial de Ga-68 pode ser de forma diferente a partir de quantidades mais elevadas de molécula funcionalizada por quelante. No entanto, um aumento da quantidade de precursor de quelado produz uma redução indesejável da radioatividade específica (rácio entre o produto radioativo e o produto não marcado) que pode piorar os resultados do diagnóstico. Na verdade, devido à competição com a molécula marcada para o mesmo recetor, a presença da molécula não marcada pode ter um efeito negativo sobre a concentração de radioatividade no tecido alvo. Assim, uma SRA elevada (radioatividade específica) pode ser crucial

para fornecer um contraste suficiente em imagens PET entre o tecido alvo e a sua envolvente. No estado da técnica, a presença de iões metálicos competem é normalmente reduzida através de pré-purificação ou fracionamento do eluato antes da marcação (tal como descrito pela patente WO 2010/092114), mas estes passos fornecem uma perda desvantajosa de atividade de partida. Além disso, se as etapas de pré-marcação, bem como, a purificação final não podem ser evitadas, a marcação de Ga-68 será sempre com base, em certa medida, na automação, usando um módulo de síntese, fazendo com que o kit de estratégia seja inviável. Além, dos conhecimentos técnicos necessários, isto requer um tempo prolongado desfavorável para a marcação. Devido à curta semivida do radioisótopo ( $t_{1/2} = 68$  minutos) e a atividade limitada fornecida pelo gerador, qualquer melhoria visando obter uma complexação muito rápida, direta e de alto rendimento é altamente desejável.

De todo o dito acima, é evidente a necessidade de um processo que permita a preparação de complexos de  $^{68}\text{Ga}$  que superem os problemas referidos acima.

#### Sumário da invenção

É descrito um processo para a preparação de complexos contendo  $^{68}\text{Ga}$ , em que um tampão de ácido fórmico/formato, possivelmente na presença de compostos capazes de sequestrar os catiões de metais, é utilizado na reação de complexação.

#### Descrição detalhada da invenção

A presente invenção permite ultrapassar o referido problema acima através de um processo em que o Ga-68 é eficazmente complexado por uma molécula quelante funcionalizada num tampão aquoso de ácido fórmico/formato.

O acima referido tampão de ácido fórmico/formato não só permite estabelecer o pH certo, mas, também, tolerar a variação de volume/acidez do eluato.

Na verdade, a sua capacidade de tamponamento está centrada num valor de pH adequado para a complexação de Ga-68 e não tem capacidade de complexação de metal, de modo que não proporcionam a interferência com a marcação. Além disso, este tampão deve ser compatível com a aplicação farmacêutica, porque o ácido fórmico é classificado como solvente residual da classe 3 (solventes com baixo potencial tóxico) na Pharmacopoeia para o qual um limite de 5 mg/ml (5000 ppm) é admitido.

Normalmente, como formato, o formato de sódio é o preferido, mas também qualquer outro sal metálico do ácido fórmico pode ser usado.

A proporção de ácido fórmico/formato está normalmente compreendida entre 1 e 3,5.

Além disso, a fim de enfrentar o problema da presença de impurezas metálicas, em vez de aumentar a quantidade de molécula funcionalizada por quelante (proporcionando uma redução do SRA) ou pré-tratamento com o eluato gerador de passos de purificação que consomem tempo e radioatividade, como é prática normal na técnica, verificou-se que agente sequestrador pode ser utilizado no processo a fim de neutralizar as espécies interferentes que saem do Ga-68 mais livre para reagir com a molécula quelante funcionalizada.

Estes agentes sequestradores, se presentes, agem como molécula quelante funcionalizada de suporte que, temporária ou permanentemente, subtrai os metais que competem para a reação com as moléculas de quelatos funcionalizadas.

Vale a pena notar que a função dos agentes sequestradores na presente invenção é oposta à função dos agentes sequestradores utilizados na técnica anterior, tal como descrito acima.

Na verdade, de acordo com os procedimentos conhecidos, no final da marcação, um agente sequestrador com particular afinidade para o gálio pode ser adicionado de modo a quelar a porção não reagente do isótopo, enquanto, de acordo com a presente invenção, um agente sequestrador capaz de minimizar a competição de impurezas metálicas é adicionado no início da reação.

Obviamente, os agentes sequestradores utilizados na presente invenção devem, preferencialmente, ligar os metais concorrentes, em vez do ião Ga-68, a fim de evitar a interferência com a reação de marcação principal ou a formação de espécies marcadas adicionais.

De acordo com a invenção, com as moléculas por quelante funcionalizadas pretende-se significar qualquer molécula com capacidade de direcionamento funcionalizado com um quelato capaz de complexar isótopos radioativos, tais como Ga-68.

Quelatos preferidos para a complexação do Ga-68 de acordo com a invenção podem ser escolhidos entre: DOTA e seus derivados, NOTA e seus derivados, PCTA e seus derivados.

A utilização pode também ser feita, em geral, de qualquer quelato capaz de formar uma gaiola suficientemente estável em torno do  $\text{Ga}^{3+}$ , em particular qualquer grupo alifático, de amina linear ou macrocíclica, ou amina macrocicla com aminas terciárias.

Como molécula com capacidade de direcionamento, pretende-se uma molécula capaz de orientar um processo biológico de

interesse terapêutico ou diagnóstico, vantajosamente, um aminoácido, um péptido, vantajosamente compreendendo 4 a 15, ou de 4 a 10 aminoácidos, um polipeptídeo, uma proteína, uma vitamina, um monos sacárido ou polissacárido, um anticorpo, um ácido nucleico ou um aptâmero.

Entre as moléculas com capacidade de direcionamento úteis para a presente invenção, podemos citar (como exemplo e não como limitação):

- Moléculas de direcionamento recetoras de VEGF
- Análogos de bombesina ou moléculas de direcionamento recetoras de GRP
- Moléculas de direcionamento recetoras de somatostatina
- Péptidos RGD ou moléculas de direcionamento avp3 e avp5
- Anexina V ou moléculas de direcionamento de processos apoptóticos
- Moléculas de direcionamento recetoras de estrógeno
- Moléculas de direcionamento da placa de ateroma
- Moléculas de direcionamento recordadas em Topics of Current Chemistry, vol.222, 260-274, Fundamentals of Receptor-based Diagnostic Metallopharmaceuticals.

Os agentes sequestradores, se presentes, são de preferência escolhidos no grupo que consiste em:

- glicina e outros aminoácidos de quelação (por exemplo, metionina, cisteína, etc ...)
- éteres de coroa e éteres de coroa de azoto

- composto orgânico eterocíclico, por exemplo, 1,10-fenantrolina, 2,2'-bipiridina
- calixarenos
- quelantes polidentados, por exemplo, proteínas, polissacáridos e ácidos polinucleicos
- agentes quelantes naturais, como catequinas, taninos, porfirina
- em geral, agentes quelantes lineares ou macrocíclicos (por exemplo podandos ou criptandos)

Normalmente quantidades micromolares ou, mais vantajosamente, quantidades nanomolares de agente sequestrador são usadas, de preferência, a menos de 100 nanomolar, por exemplo, num intervalo entre 20 e 25 nanomolar.

De preferência, a reação de complexação é realizada num intervalo de pH entre 3 e 4,5, mais preferencialmente entre 3,2 e 4,2, mais preferencialmente entre 3,4 e 4,0.

Os complexos obtidos de acordo com o processo acima descrito são também uma forma de realização da presente invenção; podem conter ácido fórmico/formato abaixo de 10 mg/ml e o agente sequestrador (se usado) inferior a 100 nmoles.

Conforme referido, um gerador comercial (que consiste numa coluna de resina de germânio) é eluído com um eluente que contém um ácido (normalmente HCL) diretamente para um frasco contendo tampão de formato e uma base.

Uma molécula funcionalizada por quelante (normalmente na presença de um agente sequestrador de metais, como, por exemplo, fenantrolina) é adicionada para dentro do frasco e

o frasco de reação é aquecido durante um curto espaço de tempo; a solução do produto é recolhida e verificada por HPLC de fase reversa e ITLC (MeOH/ acetato de amónio 1M/1/1).

A ordem de adição pode, também, ser invertida.

Por exemplo, o gerador comercial pode ser eluído com um eluente que contém um ácido (normalmente HCl) diretamente num frasco contendo uma molécula quelante funcionalizada (de preferência na presença de um agente sequestrador de metal, como, por exemplo, fenantrolina).

O tampão de formiato e a base são adicionados no frasco e a mistura de reação é aquecida durante um curto espaço de tempo.

O eluato de ácido é normalmente constituído por uma solução aquosa de um ácido forte como, por exemplo, HCl, enquanto a base é uma solução aquosa de uma base forte como, por exemplo, NaOH.

De um modo geral, a utilização de tampão de formato garante um pH adequado, mesmo que ocorram variações na acidez do eluato e, deste modo reduz, a quantidade de Ga-68 não complexado devido a um pH muito baixo ou demasiado elevado, resultando em alto teor de  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  livre ou hidróxidos de  $^{68}\text{Ga}$ , respetivamente. Além disso, a adição de um agente sequestrador permite reduzir a quantidade de molécula funcionalizada por quelante necessária para se obter uma complexação de completa Ga-68.

Estes dois aspetos permitiram ao requerente alcançar um grau adequado de complexação, vantajosamente, pelo menos, 92%, 95% e 97%, e, consequentemente, um grau de pureza suficiente (pelo menos 92%, 95% e 97%), sem qualquer tipo de pré- ou purificação final. Uma vez que os resultados obtidos

confirmam a viabilidade de uma marcação de Ga-68 direta que não requer manipulação ou a purificação, a formulação pode ser aplicada para a produção de um kit específico.

Portanto, de acordo com uma forma de realização particular, a invenção refere-se também a um kit compreendendo:

- um frasco siliconizado contendo a molécula funcionalizada por quelante e o agente sequestrador selecionado;
- um frasco siliconizado ou uma seringa que contém uma mistura ultrapura apropriada de ácido fórmico/formato de sódio.

Além disso, a invenção refere-se também a um único frasco contendo a molécula funcionalizada por quelante, o agente sequestrador seleccionado e uma mistura ultrapura adequada de ácido fórmico/formato de sódio.

### **Exemplo 1**

#### **Marcação de péptido de $^{68}\text{Ga}\text{DOTA}$ com 3 mL de eluato de HCl 0,6M**

Um gerador de 30 mCi comercial (a partir de IDB) tendo uma fase estacionária de  $\text{SnO}_2$  foi eluída com 3 ml de eluato ultrapuro de HCl 0,6 M diretamente para um frasco contendo 200  $\mu\text{l}$  de tampão de formato ultrapuro 1,5 M e 400  $\mu\text{l}$  de NaOH ultrapuro 4,5 M. Depois, 30  $\mu\text{g}$  de péptido DOTA e 4,5  $\mu\text{g}$  de 1,10-fenantrolina são adicionados e o frasco de reação é aquecido a 95°C durante 7 minutos. O produto foi verificado por HPLC de fase reversa e ITLC (MeOH/acetato de amônio 1M. 1/1) e a pureza radioquímica foi de 98% em ambos os testes.

**Exemplo 2****Marcação de péptido de  $^{68}\text{Ga}\text{DOTA}$  com 3,2 mL de eluato de HCl 0,6M**

Um gerador de 30 mCi comercial (a partir de IDB) tendo uma fase estacionária de  $\text{SnO}_2$  foi eluída com 3,2 ml de eluato ultrapuro de HCl 0,6 M diretamente para um frasco contendo 200  $\mu\text{l}$  de tampão de formato ultrapuro 1,5 M e 400  $\mu\text{l}$  de NaOH ultrapuro 4,5 M. Depois, 30  $\mu\text{g}$  de péptido DOTA e 4,5  $\mu\text{g}$  de 1,10-fenantrolina são adicionados e o frasco de reação é aquecido a 95°C durante 7 minutos. O produto foi verificado por HPLC de fase reversa e ITLC (MeOH / acetato de amónio 1M. 1/1) e a pureza radioquímica foi de 97% em ambos os testes.

**Exemplo 3:****Marcação de péptido de  $^{68}\text{Ga}\text{DOTA}$  com 3 mL de eluato de HCl 0,6M**

Um gerador de 30 mCi comercial (a partir de IDB) tendo uma fase estacionária de  $\text{SnO}_2$  foi eluída com 3 ml de eluato ultrapuro de HCl 0,6 M diretamente para um frasco contendo 200  $\mu\text{l}$  de tampão de formato ultrapuro 1,5 M e 400  $\mu\text{l}$  de NaOH ultrapuro 4,5 M. Depois, 30  $\mu\text{g}$  de péptido DOTA e 15  $\mu\text{g}$  de 12-coroa-4 são adicionados e o frasco de reação é aquecido a 95°C durante 7 minutos. O produto foi verificado por HPLC de fase reversa e ITLC (MeOH / acetato de amónio 1M. 1/1) e a pureza radioquímica foi de 98% e de 96%, respetivamente.

**Exemplo 4:****Marcação de péptido de  $^{68}\text{Ga}\text{DOTA}$  com 3 mL de eluato de HCl 0,6M**

Um gerador de 30 mCi comercial (a partir de IDB) tendo uma fase estacionária de  $\text{SnO}_2$  foi eluída com 3 ml de eluato ultrapuro de HCl 0,6 M diretamente para um frasco contendo

30  $\mu$ l de péptido DOTA e 15  $\mu$ g de 12-coroa-4. Depois, 200  $\mu$ l de tampão de formato ultrapuro 1,5 M e 400  $\mu$ l de NaOH ultrapuro 4,5 M são adicionados e o frasco de reação é aquecido a 95°C durante 7 minutos. O produto foi verificado por HPLC de fase reversa e ITLC (MeOH / acetato de amónio 1M. 1/1) e a pureza radioquímica foi de 98% e de 96%, respetivamente.

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Processo para a preparação de complexos de  $^{68}\text{Ga}$ , em que é realizada a reação complexante entre uma molécula funcionalizada por quelante e  $^{68}\text{Ga}$  numa solução aquosa de tampão de ácido fórmico/formato, eventualmente, na presença de um composto capaz de sequestrar os catiões de metais, em que o referido composto capaz de sequestrar os catiões de metais, se utilizado, é adicionado no início da reação de complexação.
2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a referida molécula funcionalizada por quelante é escolhido no grupo que consiste em: DOTA e seus derivados, NOTA e seus derivados, PCTA e seus derivados enquanto o referido formato é formato de sódio.
3. Processo de acordo com as reivindicações 1 e 2, em que o rácio de ácido fórmico/formato na mistura de marcação está compreendido entre 1 e 3,5
4. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que o referido agente sequestrador é escolhido no grupo que consiste em: glicina e outros aminoácidos quelantes, éteres de coroa e éteres de coroa de azoto, composto heterocíclico orgânico, calixarenos, quelantes polidentados, agentes quelantes naturais, por exemplo, catequinas, tanino, porfirina, agentes quelantes lineares ou macrocíclicos.
5. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a reação de complexação é realizada num intervalo de pH entre 3 e 4,5.
6. Processo de acordo com a reivindicação 5, em que o pH da reação está compreendido entre 3,2 e 4,2.
7. Processo de acordo com a reivindicação 5, em que o pH da reação se situa entre 3,4 e 4,0.

8. Processo de acordo com as reivindicações 1-7, em que:

- Um gerador comercial de  $^{68}\text{Ga}$  é eluído com um eluato contendo um ácido diretamente para um frasco contendo um tampão de formato e uma base;
- Uma molécula funcionalizada por quelante é adicionada durante um curto espaço de tempo;
- O produto é recolhido

9. Processo de acordo com as reivindicações 1-7, em que:

- Um gerador comercial de  $^{68}\text{Ga}$  é eluído com um eluato contendo um ácido diretamente para um frasco contendo uma molécula funcionalizada por quelante;
- Tampão de formato e uma base são adicionados ao frasco e o frasco de reação é aquecido durante um curto espaço de tempo;
- O produto é recolhido

10. Processo de acordo com as reivindicações 8 ou 9, em que o eluato de ácido é uma solução aquosa de HCl, enquanto a base é uma solução aquosa de NaOH.

11. Kit de reação que compreende:

- Um frasco contendo a molécula funcionalizada por quelante e um composto capaz de sequestrar os catiões de metais;
- Um frasco ou uma seringa que contém uma mistura ultrapura apropriada de ácido fórmico/formato de sódio.

12. Frasco contendo uma molécula funcionalizada por quelante, um composto selecionado capaz de sequestrar os

catiões de metais e uma mistura ultrapuro adequada de de ácido fórmico/formato de sódio

13. Kit de reação de acordo com a reivindicação 11 e frascos de acordo com a reivindicação 12, em que os referidos frascos são frascos siliconizados.