



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 122020011908-0 B1**



**(22) Data do Depósito:** 10/08/2012

**(45) Data de Concessão:** 05/07/2022

---

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

**(51) Int.Cl.:** C07B 59/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 12/08/2011 IT FI2011A000180.

**(73) Titular(es):** ADVANCED ACCELERATOR APPLICATIONS INTERNATIONAL S.A..

**(72) Inventor(es):** LORENZA FUGAZZA; MARIA AZZURRA FILANNINO; MAURIZIO FRANCO MARIANI.

**(86) Pedido PCT:** PCT EP2012065659 de 10/08/2012

**(87) Publicação PCT:** WO 2013/024013 de 21/02/2013

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 12/06/2020

**(62) Pedido Original do Dividido:** BR112014003336-6 - 10/08/2012

**(57) Resumo:** Um processo para a preparação de complexos contendo 68Ga, em que um tampão de ácido fórmico/formiato na presença de compostos capazes de sequestrar cátions de metal é usado na reação de formação de complexos.

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

Dividido do BR 11 2014 003336 6, depositado em 10/08/2012

Campo da invenção

[001] A invenção lida com processos para a preparação de complexos contendo isótopos, em particular, complexos úteis como radiomarcadores contendo o isótopo  $^{68}\text{Ga}$ .

Estado da técnica

[002] Apesar dos resultados promissores dos estudos clínicos recentes que utilizam o radiomarcador rotulado como  $^{68}\text{Ga}$  para imagiologia por PET, *in vivo*, a meia vida curta do isótopo (68 minutos) não permite uma distribuição de longo alcance em conjunto com a necessidade de uma “produção radio-farmacológica” para o processo de marcação, ainda proíbe a sua utilização generalizada na rotina da medicina nuclear.

[003] A marcação com o Ga-68 é realizada através da complexação [formação de complexos] do metal radioativo com um agente quelante adequado, em um 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 (referida como molécula funcionalizada por quelante ou, na nossa aplicação, precursora) e um tampão apropriado para assegurar o pH ideal para a formação de complexos.

[004] O então chamado gerador de  $^{68}\text{Ga}$  é uma resina comercialmente disponível e que contém germânio, a partir do qual o  $^{68}\text{Ga}$  desejado é formado naturalmente pelo decaimento do germânio; portanto, a eluição da resina, sob as condições de pH adequadas, e na presença de uma molécula funcionalizada por quelante, permite a formação do complexo desejado contendo o  $^{68}\text{Ga}$ ; dependendo da molécula funcionalizada por quelante selecionada, pode ser necessário o aquecimento de 75 a 90 °C.

[005] Os principais limites para o sucesso da marcação são fornecidos pelo

fato de que o pH adequado deve ser mantido constante e por competição das impurezas metálicas com o Ga-68 durante o processo de formação de complexos.

[006] Em vista do mencionado acima, a pesquisa de um tampão adequado, capaz de assegurar um pH padrão é, obviamente, um assunto tema continuamente investigado pelos especialistas na marcação do  $^{68}\text{Ga}$  e ainda em aberto.

[007] Tal tampão deve ser não tóxico, apto para tamponar na gama de pH de 3,5 a 5,0, não deve competir com os íons de gálio e, de preferência, apresentar uma fraca capacidade de formação de complexos do metal.

[008] Entre os diferentes tampões relatados, os usados principalmente até o momento são os tampões HEPES (derivados de ácido sulfônico) ou acetato; no entanto, eles permitem trabalhar somente em uma gama restrita de pH (Publicação de Velikyan *et al.*, Bioconjugate Chem, 2008, 19, 569-573) e pode não mais reter a capacidade exigida do tampão quando a acidez do eluato varia um pouco.

[009] Por exemplo, até mesmo um pequeno aumento no volume do elutato vindo do gerador faz com que o pH mude para valores que danificam a formação de complexos, resultando em elevada quantidade de Ga-68 livre. Isso gera um risco de não cumprimento que torna obrigatória a purificação final. Em adição, não há dados toxicológicos disponíveis a respeito do tampão de HEPES: a purificação final também tem de ser realizada, a fim de remover, ou ao menos reduzir, o HEPES antes da administração do radiofármaco. Outros tampões foram propostos recentemente (WO 2010/092114) como uma solução eficaz para a formação de complexos do Ga-68, por exemplo, tampões de lactato, tartarato e carbonato. Estes tampões compreendem ao menos duas funções de coordenação do Ga-68, superando o prejuízo que eles poderiam interferir com a marcação. De qualquer forma, a sua utilização tem sido testada com sucesso

com frações reduzidas e purificadas do eluato gerador, sem isentar do tratamento de pré-marcação da solução de Ga-68.

[0010] Um segundo limite importante é a competição de impurezas metálicas, principalmente os cátions trivalentes e bivalentes que derivam tanto da fase estacionária quanto do decaimento do Ga-68 (Zn). Estes metais são ligados, bem como o Ga-68, pela molécula funcionalizada por quelante, reduzindo o número de moléculas efetivamente disponíveis para a marcação. Isto pode resultar em uma formação de complexo incompleta do Ga-68, reduzindo a pureza radioquímica final da preparação. No estado da arte, 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 excedente de quelante com afinidade reconhecida para o isótopo, (por exemplo, o agente quelante EDTA), a fim de evitar a presença de elevada porção de metais livres e para promover a sua eliminação, no caso da administração da preparação do radiofármaco (WO 2010/141833 - Exemplo 2). Uma formação de complexos parcial do Ga-68 pode ser diferente em face das grandes quantidades de molécula funcionalizada por quelante. No entanto, um aumento da quantidade de precursor quelatado produz uma redução indesejável da radioatividade específica (a taxa entre o produto radioativo e o produto não marcado) que pode piorar os resultados do diagnóstico. De fato, devido à competição com a molécula marcada para o mesmo receptor, a presença da molécula não marcada pode apresentar um efeito negativo sobre a concentração de radioatividade no tecido alvo. Assim, uma SRA (radioatividade específica) elevada pode ser crítica para o fornecimento de um contraste suficiente em imagens de PET entre o tecido alvo e o seu adjacente. No estado da arte, a presença de íons metálicos em competição é normalmente reduzida pela pré-purificação ou fracionamento do eluato antes da marcação (conforme descrito na patente WO 2010/ 092114), mas estas medidas fornecem uma perda

desvantajosa da atividade de partida. Em adição, se as etapas de pré-marcação, bem como a purificação final, não podem ser evitadas, a marcação do Ga-68 sempre será baseada, em certa medida, na automação, pelo uso de um módulo de síntese, tornando inviável a estratégia do kit. Apesar do conhecimento técnico necessário, isso requer tempo prolongado desfavorável para a marcação. Devido à meia vida curta do radionuclídeo ( $t_{1/2} = 68$  minutos) e a atividade limitada fornecida pelo gerador, qualquer aperfeiçoamento que vise obter uma formação de complexos direta, muito rápida e de alto rendimento, é altamente desejável.

[0011] A partir de tudo o mencionado acima, é evidente a necessidade de um processo que permita a preparação de complexos de  $^{68}\text{Ga}$  que superem os problemas mencionados acima.

#### Sumário da invenção

[0012] É descrito um processo para a preparação de complexos contendo  $^{68}\text{Ga}$ , no qual um tampão de ácido fórmico/formiato, possivelmente na presença de compostos capazes de sequestrar os cátions de metais, é utilizado na reação de formação de complexos.

#### Descrição detalhada da invenção

[0013] A presente invenção permite superar o problema mencionado acima por meio de um processo no qual o Ga-68 é formado em complexo de forma efetiva por uma molécula funcionalizada por quelante em um tampão aquoso de ácido fórmico/formiato.

[0014] O tampão de ácido fórmico/formiato mencionado acima não apenas permite estabelecer o pH correto, mas também tolerar a variação de volume/acidez do eluato.

[0015] De fato, a sua capacidade de tamponamento é centrada em um valor de pH adequado para a formação de complexos do Ga-68 e não apresenta a capacidade de formação de complexos de metal, de modo que não fornece

interferência com a marcação. Em adição, este tampão deve ser compatível com a aplicação farmacêutica, devido ao ácido fórmico ser classificado como solvente residual classe 3 (solventes com baixo potencial tóxico) na farmacopeia para que um limite de 5 mg/ml (5000 ppm) seja admitido.

[0016] Normalmente, como formiato, é preferido o formiato de sódio, mas qualquer outro sal metálico do ácido fórmico também pode ser usado.

[0017] A proporção de ácido fórmico/formiato é normalmente compreendida entre 1 e 3,5.

[0018] Em adição, a fim de enfrentar o problema da presença de impurezas metálicas, em vez de aumentar a quantidade da molécula funcionalizada por quelante (fornecendo uma redução do SRA) ou o pré-tratamento do eluato gerador com as etapas de purificação que consomem tempo e radioatividade, como é praxe normal na arte, foi descoberto que o agente sequestrante pode ser utilizado no processo a fim de neutralizar as espécies interferentes que deixam o Ga-68 mais livre para reagir com a molécula de quelante funcionalizado.

[0019] Estes agentes sequestrantes, se presentes, agem como molécula funcionalizada por quelante de suporte que, de forma temporária ou permanente, subtrai os metais que competem na reação com as moléculas de quelatadas funcionalizadas.

[0020] É importante notar que a função dos agentes sequestrantes na presente invenção é a oposta à função dos agentes sequestrantes utilizados no estado da arte, conforme descrito acima.

[0021] De fato, de acordo com os procedimentos conhecidos, no final da marcação de um agente sequestrante, com particular afinidade para o gálio, ele pode ser adicionado a fim de quelar a porção não reagida do isótopo, enquanto que, de acordo com a presente invenção, no início da reação, é adicionado um agente sequestrante apto para minimizar a competição das impurezas metálicas.

[0022] Obviamente, os agentes sequestrantes utilizados na presente invenção devem, de preferência, se ligar aos metais concorrentes, em vez do íon de Ga-68, a fim de evitar a interferência com a principal reação de marcação ou a formação das espécies secundárias marcadas.

[0023] Em adição, de acordo com uma forma de realização particular, a invenção se refere também a processos para os radioisótopos de formação de complexos e, em particular, ao  $^{68}\text{Ga}$ , sendo que as soluções tamponadas são utilizadas em combinação com agentes sequestrantes conforme acima e descrito a seguir.

[0024] De acordo com a invenção, por moléculas funcionalizadas por quelantes, é pretendida qualquer molécula com a capacidade de segmentação funcionalizada com um quelato apto para complexar os isótopos radioativos tais como o Ga-68.

[0025] Os quelatos preferidos para a formação de complexos do Ga-68 de acordo com a invenção podem ser escolhidos entre: DOTA e seus derivados, NOTA e os seus derivados, PCTA e seus derivados.

[0026] Em geral, também pode ser feito o uso de qualquer quelato apto para formar uma gaiola suficientemente estável em torno  $\text{Ga}^{3+}$ , em particular, amina qualquer alifático, macrocíclico ou amina linear, ou amina macrociclo com aminas terciárias.

[0027] Como molécula com capacidade de mirar é pretendida uma molécula capaz de focar um processo biológico de interesse terapêutico ou diagnóstico, vantajosamente um aminoácido, um peptídeo, compreendendo vantajosamente de 4 a 15, ou de 4 a 10 aminoácidos, um polipeptídeo, uma proteína, um vitamina, um monossacarídeo ou um polissacárido, um anticorpo, um ácido nucléico ou um aptâmero.

[0028] Entre as moléculas com capacidade de mirar úteis para a invenção, pode-se citar (como exemplo e não como lista limitativa):

- moléculas que focam os receptores de VEGF
- análogos de bombesina ou moléculas que focam os receptores de GRP
- moléculas que focam os receptores de somatostatina
- os peptídeos RGD ou moléculas que focam o  $\alpha v\beta 3$  e  $\alpha v\beta 5$
- anexina V ou moléculas que focam os processos apoptóticos
- moléculas que focam os receptores de estrogênio
- moléculas que focam a placa de ateroma
- as moléculas alvo exibidas em Topics in Current Chemistry, vol.222, 260-274, Fundamentals of Receptor-based Diagnostic Metallopharmaceuticals.

[0029] Os agentes sequestrantes, se presentes, de preferência, são escolhidos no grupo constituído por:

- glicina e outros aminoácidos de quelação (por exemplo, metionina, cisteína, etc...)
- éteres de coroa e éteres de coroa de nitrogênio
- composto orgânico eterocíclico, por exemplo, 1,10-fenantrolina, 2,2'-Bipiridina
- calixarenos
- quelante polidentado, por exemplo, proteínas, polissacarídeos, e os ácidos polinucleicos
- os agentes quelantes naturais, por exemplo, catequinas, taninos, porfirina
- agentes quelantes lineares ou macrocíclicos em geral (por exemplo os podandos ou criptandos)

[0030] Normalmente, quantidades micromolares ou, mais vantajosamente nanomolares, de agente sequestrante são usadas, de preferência, abaixo de 100 nanomolar, por exemplo, em um intervalo entre 20 e 25 nanomolar.

[0031] É importante notar que os agentes sequestrantes conforme explicados acima podem ser vantajosamente utilizados também na reação de



formação de complexos em que são utilizados outros tampões.

[0032] Portanto, é outra forma de realização da presente invenção, um processo que compreende aqui a reação de formação de complexos de isótopos radioativos, em especial o  $^{68}\text{Ga}$ , em que os agentes sequestrantes conforme definidos acima são adicionados ao tampão de reação.

[0033] De preferência, a reação de formação de complexos é realizada em uma faixa de pH entre 3 e 4,5, mais preferivelmente entre 3,2 e 4,2, ainda mais preferivelmente entre 3,4 e 4,0.

[0034] Os complexos obtidos de acordo com o processo descrito acima também são uma forma de realização da presente invenção; eles podem conter ácido fórmico/formiato abaixo de 10 mg/ml e o agente sequestrante (se utilizado) abaixo de 100 nmoles.

[0035] Conforme mencionado, um gerador comercial (que consiste em uma coluna de resina de suporte de germânio) é eluído com um eluente contendo um ácido (normalmente HCL) diretamente em um frasco contendo formiato de tampão e uma base.

[0036] Uma molécula funcionalizada por quelante (normalmente na presença de um agente sequestrante de metais, como por exemplo, a fenantrolina) é adicionada em um frasco e o frasco de reação é aquecido durante um curto período de tempo; a solução do produto é coletada e verificada por HPLC de fase reversa e ITLC (MeOH/acetato de amônia 1M 1/1).

[0037] A ordem da adição também pode ser invertida.

[0038] Por exemplo, o gerador comercial pode ser eluído com um eluente contendo um ácido (normalmente HCl) diretamente em um frasco contendo uma molécula funcionalizada por quelante (de preferência, na presença de um agente sequestrante de metal tal como, por exemplo, a fenantrolina).

[0039] O tampão de formiato e a base são adicionados no frasco e a mistura de reação é aquecida durante um curto período de tempo.

[0040] O eluato de ácido normalmente é constituído por uma solução aquosa de um ácido forte tal como, por exemplo, HCl, enquanto a base é uma solução aquosa de uma base forte tal como, por exemplo, NaOH.

[0041] De um modo geral, a utilização do tampão de formiato garante um pH adequado, mesmo se ocorrerem variações na acidez do eluato e, deste modo, reduzir a quantidade de Ga-68 não complexado, devido a um pH muito baixo ou um pH muito elevado, resultando em elevado conteúdo de  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  livre ou hidróxidos de  $^{68}\text{Ga}$ , respectivamente. Além disso, a adição de um agente sequestrante permite reduzir a quantidade de moléculas funcionalizadas por quelante necessárias para se obter uma formação de complexos completa do Ga-68.

[0042] Estes dois aspectos permitiram ao requerente alcançar um grau de formação de complexos adequado, vantajosamente de ao menos 92%, 95% e 97%, e, conseqüentemente, uma pureza suficiente (de ao menos 92%, 95% e 97%), sem qualquer tipo de pré-purificação ou purificação final. Uma vez que os resultados obtidos confirmam a viabilidade de uma marcação direta de Ga-68 que não requer a manipulação ou purificação, a formulação pode ser aplicada na produção de um kit específico.

[0043] Portanto, de acordo com uma forma de realização particular, a invenção se refere também a um kit que compreende:

- um frasco siliconizado contendo a molécula funcionalizada por quelante e o agente sequestrante selecionado;
- um frasco siliconizado ou uma seringa contendo uma mistura adequada de formiato de sódio/ácido fórmico ultra pura.

[0044] Em adição, a invenção também se refere a um único frasco contendo a molécula funcionalizada por quelante, o agente sequestrante selecionado e uma mistura adequada de formiato de sódio/ácido fórmico ultra pura.

Exemplo 1Marcação de peptídeo DOTA-<sup>68</sup>Ga com 3 ml de eluato de HCl 0,6 M

[0045] Foi eluído um gerador comercial 30 mCi (de IDB) apresentando uma fase estacionária de SnO<sub>2</sub> com 3 ml de eluato HCl 0,6 M ultra puro, diretamente em um frasco contendo 200 µl de tampão de formiato 1,5 M ultra puro e 400 µl de NaOH 4,5 M ultra puro. A seguir, são adicionados 30 µg de peptídeo DOTA e 4,5 µg de 1,10-fenantrolina 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 amônia 1M 1/1) e a pureza radioquímica resultou em 98% em ambos os testes.

Exemplo 2Marcação de peptídeo DOTA de <sup>68</sup>Ga com 3,2 ml de eluato de HCl 0,6 M

[0046] Foi eluído um gerador comercial 30 mCi (de IDB) apresentando uma fase estacionária de SnO<sub>2</sub> com 3,2 ml de eluato de HCl 0,6 M ultra puro, diretamente em um frasco contendo 200 µl de tampão de formiato 1,5 M ultra puro e 400 µl de NaOH 4,5 M ultra puro. A seguir, são adicionados 30 µg de peptídeo DOTA e 4,5 µg de 1,10-fenantrolina 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 amônia 1M 1/1) e a pureza radioquímica resultou em 97% em ambos os testes.

Exemplo 3:Marcação de peptídeo DOTA de <sup>68</sup>Ga com 3 ml de eluato de HCl 0,6 M

[0047] Foram eluídos, em um gerador comercial 30 mCi (de BID) apresentando uma fase estacionária de SnO<sub>2</sub> com 3 ml de eluato de HCl 0,6 M ultra puro, diretamente em um frasco contendo 200 µl de tampão de formiato 1,5 M ultra puro e 400 µl de NaOH 4,5 M ultra puro. A seguir, são adicionados 30 µg de peptídeo DOTA e 15 µg de 12-coroa-4 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 amônia 1M 1/1) e a pureza radioquímica resultou em respectivamente 98% e 96%.

Exemplo 4:

Marcação de peptídeo DOTA de  $^{68}\text{Ga}$  com 3 ml de eluato de HCl 0,6 M

[0048] Foi eluído um gerador comercial 30 mCi (de IDB) apresentando uma fase estacionária de  $\text{SnO}_2$  com 3 ml de eluato de HCl 0,6 M ultra puro, diretamente em um frasco contendo 30  $\mu\text{g}$  de peptídeo DOTA e 15  $\mu\text{g}$  de 12-coroa-4. A seguir, são adicionados 200  $\mu\text{l}$  de tampão de formiato 1,5 M ultra puro e 400  $\mu\text{l}$  de NaOH 4,5 M ultra puro 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 amônia 1M 1/1) e a pureza radioquímica resultou em respectivamente 98% e 96%.

### REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a preparação de complexos de  $^{68}\text{Ga}$ , **caracterizado** pelo fato de que a reação de formação de complexos entre uma molécula funcionalizada por quelante e  $^{68}\text{Ga}$  é realizada em uma solução aquosa tamponada tendo uma faixa de pH de 3,0 a 4,5 na presença de um agente sequestrante, em que o referido agente sequestrante é adicionado no início da reação de formação de complexos e é escolhido no grupo que consiste em: 12-coroa-4, 1,10-fenantrolina e 2,2'-bipiridina,

e em que a referida molécula funcionalizada por quelante é escolhida no grupo que consiste em: DOTA e seus derivados, NOTA e seus derivados, PCTA e seus derivados.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o pH da reação é compreendido entre 3,2 e 4,2.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que o pH da reação é compreendido entre 3,4 e 4,0.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a solução aquosa tamponada é um tampão aquoso de ácido fórmico/formiato.

5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que:

- um gerador comercial de  $^{68}\text{Ga}$  é eluído com um eluato contendo um ácido diretamente em um frasco contendo tampão formiato e uma base;
- um agente sequestrante é adicionado;
- uma molécula funcionalizada por quelante é adicionada no frasco e o frasco de reação é aquecido durante um curto período de tempo;
- o produto é coletado.

6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que:

- um gerador comercial de  $^{68}\text{Ga}$  é eluído com um eluato contendo um ácido diretamente em um frasco contendo uma molécula funcionalizada por quelante;
- um agente sequestrante é adicionado;
- um tampão e uma base são adicionados no frasco e o frasco de reação é aquecido durante um curto período de tempo;
- o produto é coletado.

7. Processo de acordo com a reivindicação 5 ou 6, **caracterizado** pelo fato de que o eluato ácido é uma solução aquosa de HCl, enquanto a base é uma solução aquosa de NaOH.