



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 165**

51 Int. Cl.:

C07H 13/04 (2006.01)

C07H 13/10 (2006.01)

C07H 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05813632 .6**

96 Fecha de presentación : **18.11.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1817320**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.08.2007**

54 Título: **Procedimiento de fluoración para la síntesis de 2-[¹⁸F]fluoro-2-desoxi-D-glucosa.**

30 Prioridad: **19.11.2004 GB 0425501**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.10.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.10.2010

73 Titular/es: **GE Healthcare Limited**
Amersham Place
Little Chalfont, Buckinghamshire HP7 9NA, GB

72 Inventor/es: **Osborn, Nigel John;**
Grigg, Julian;
Pettitt, Roger Paul;
Wilson, Anthony y
Powell, Nigel Anthony

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 347 165 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

Procedimiento de fluoración para la síntesis de 2-[¹⁸F]fluoro-2-desoxi-D-glucosa.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la fluoración de derivados de azúcar y, en particular, la invención se refiere a la producción de glucosa fluorada. El procedimiento es especialmente útil para la producción de derivados de azúcar radiofluorados, para su uso en procedimientos tales como tomografía de emisión de positrones (PET).

10 En los procedimientos para producir compuestos trazadores, marcados con [¹⁸F], para su uso en PET, uno de los factores más importantes es el rendimiento no corregido global de la síntesis. Éste está dictado no sólo por el rendimiento químico global del procedimiento, sino también por el tiempo de la síntesis, que es importante debido a la semivida relativamente corta de [¹⁸F], que es de 109,7 minutos.

15 El ión [¹⁸F]-fluoruro, obtenido típicamente en forma de una solución acuosa producida por irradiación en ciclotrón de una diana de [¹⁸O]-agua. Ha sido una práctica muy extendida realizar diversas etapas para convertir [¹⁸F]-fluoruro en un reactivo nucleófilo reactivo, que sea adecuado para su uso en reacciones de radiomarcaje nucleófilo. Como con las fluoraciones no radiactivas, estas etapas incluyen la eliminación de agua del ión [¹⁸F]-fluoruro y la provisión de un contraión adecuado (Handbook of Radiopharmaceuticals 2003 Welch & Redvanly eds. Pág. 6, págs 195-227). Las reacciones de radiofluoración nucleófila se realizan entonces usando disolventes anhidros (Aigbirhio y col, 1995 J. Fluor. Chem. 70 págs. 279-87). La retirada de agua del ión fluoruro se denomina preparación de ión fluoruro "puro". Se cree que la presencia de cantidades significativas de agua es el resultado de la solvatación de los iones fluoruro, que protege al fluoruro del ataque nucleófilo sobre el precursor de azúcar protegido. La retirada del agua, por lo tanto, se considera en la técnica como una etapa que es necesaria para aumentar la reactividad del fluoruro, así como para evitar que surjan subproductos hidroxilados debido a la presencia de agua (Moughamir y col, 1998 Tett. Letts. 39 págs. 7305-6).

20 El documento US 6.172.207, que se refiere a un procedimiento para sintetizar compuestos marcados con [¹⁸F], tales como [¹⁸F]-fluorodesoxiglucosa ([¹⁸F]-FDG), muestra que el agente de fluoración debe hacerse totalmente anhidro mediante adiciones de acetonitrilo a las soluciones acuosas, seguido de evaporación azeotrópica hasta sequedad.

25 El procedimiento usado más habitualmente para la síntesis de [¹⁸F]-FDG, es el de Hamacher y col, J. Nucl. Med. 27: 235-238 (1986), en que la reacción de 1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-O-trifluorometanosulfonil-8-D-manopiranososa con [¹⁸F]fluoruro, se realiza en un disolvente anhidro.

30 Hay ciertos problemas que surgen de los procedimientos usados actualmente para la producción de derivados de azúcar marcados con [¹⁸F]; uno de éstos es que retirar toda el agua residual del ión fluoruro y el disolvente tarda tiempo y, por lo tanto, afecta al rendimiento no corregido global de la síntesis. También, tanto la complejidad sintética como mecánica en cualquier sintetizador automatizado aumenta, si fuera necesario, para retirar toda el agua residual. Por ejemplo, la síntesis puede requerir más ciclos de secado, mientras que puede requerirse un calentador más potente en el sintetizador para efectuar la síntesis.

35 Adicionalmente, es difícil asegurar que la reacción de radiofluoración sea reproducible de forma consistente. Esto se debe a que, a menudo, puede haber una pequeña cantidad de agua residual en el disolvente (por ejemplo, hasta aproximadamente 1000 ppm) y el rendimiento no corregido global de la síntesis varía considerablemente de acuerdo con la cantidad de agua residual que está presente durante la reacción de marcaje. Los resultados han establecido que es posible mantener el contenido de agua a 1500 ppm +/- 200 ppm, una desviación del 15%. A 750 ppm, dicha variación de agua absoluta sería el doble de la desviación en términos de porcentaje.

40 Los presentes inventores han hecho el sorprendente descubrimiento de que no es necesario realizar la fluoración de los derivados de azúcar en condiciones anhidras. De hecho, si la cantidad de agua en la mezcla de reacción se controla cuidadosamente, la pureza radioquímica (y, de esta manera, el rendimiento global) del procedimiento mejora realmente.

45 Esto es particularmente sorprendente en vista del énfasis en la técnica anterior sobre la necesidad de realizar la reacción en condiciones anhidras.

50 Por lo tanto, en un primer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para la preparación de un derivado de glucosa fluorado, protegido, comprendiendo el procedimiento hacer reaccionar un derivado de tetraacetil manosa con un fluoruro, caracterizado porque la reacción se realiza en un disolvente que contiene agua en una cantidad mayor de 1000 ppm y menor de 50.000 ppm.

55 El procedimiento de la invención tiene ventajas considerables respecto a los procedimientos de la técnica anterior. En primer lugar, los inventores han descubierto que lejos de disminuir, el rendimiento de la reacción realmente aumenta en presencia de estas cantidades controladas de agua.

ES 2 347 165 T3

En segundo lugar, debido a que la mezcla de reacción contiene agua en una cantidad mayor de 1000 ppm, es mucho más fácil asegurar que una cantidad consistente de agua está presente en la mezcla de reacción (por ejemplo, contaminando deliberadamente el disolvente de marcaje con agua) y esto significa que las condiciones de reacción son reproducibles de forma consistente.

En tercer lugar, puede ser posible eliminar algunas de las etapas de secado usadas en los procedimientos de la técnica anterior, y esto reduciría el coste global del procedimiento en términos tanto de coste de reactivo como de coste de fabricación del sintetizador. Se espera que un procedimiento más simple impacte también positivamente sobre la fiabilidad global del procedimiento.

En la presente memoria descriptiva, la expresión “derivado de tetraacetil manosa” se refiere a un azúcar de tetraacetil manosa en la que uno de los grupos OH se reemplaza por un grupo saliente y que está opcionalmente unida a un soporte sólido, por ejemplo, como se muestra en el documento WO-A-03/002157, y los otros grupos OH del azúcar están protegidos con un grupo protector acetilo.

La expresión “derivado de glucosa fluorado, protegido” se refiere a una glucosa en la que uno de los grupos OH está reemplazado por un flúor y los otros grupos OH del azúcar están protegidos con un grupo protector adecuado.

Los grupos protectores adecuados para los derivados azúcar protegidos, usados en la invención, se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en “Protecting Groups in Organic Synthesis”, Theodora W. Greene and Peter G. M. Wuts, publicado por John Wiley & Sons Inc. Los grupos hidroxilo pueden protegerse mediante la conversión a ésteres de alquilo, por ejemplo, por reacción con un cloruro de alcanófilo, tal como cloruro de acetilo.

Los grupos salientes adecuados se conocen bien también en la técnica, e incluyen tolueno sulfonato y metano sulfonato. Sin embargo, se prefiere particularmente, que el grupo saliente sea un grupo trifluorometano sulfonato (triflato).

La reacción de fluoración generalmente será una reacción de sustitución nucleófila y reemplazar el grupo saliente por flúor puede provocar una inversión de la estereoquímica del azúcar por un mecanismo SN₂.

La reacción es especialmente adecuada para la preparación de 2-fluoro-1,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucosa (tetraacetilfluoroglucosa o pFDG) a partir de 1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-trifluorometanosulfonil-β-D-manopiranosina (triflato de tetraacetil manosa).

Los disolventes adecuados incluyen disolventes orgánicos no próticos, tales como acetonitrilo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano, dioxano, 1,2-dimetoxietano, sulfolano, *N*-metilpirrolidinona o una mezcla de cualquiera de ellos. Sin embargo, se ha descubierto que el acetonitrilo es un disolvente particularmente adecuado para la reacción.

Aunque el rendimiento de reacción mejorado se obtiene incluyendo al menos 1.000 ppm, pero menos de 50.000 ppm de agua en el disolvente, se han conseguido mejoras aún mayores cuando el contenido de agua es de aproximadamente 1000 a 15.000 ppm. Los mejores resultados se obtuvieron usando un disolvente con un contenido de agua de aproximadamente 2000 a 7000 ppm, adecuadamente de 2500 a 5000 ppm. En una realización, el contenido de agua preferido es de 3000 ppm a 6000 ppm.

Como se usa en el presente documento, el término “ppm”, cuando describe el contenido de agua de un disolvente dado, se refiere a μgramos de agua/gramo.

El nivel corregido de agua en el disolvente puede conseguirse secando un disolvente húmedo hasta que se alcance el contenido de agua deseado o añadiendo una cantidad adecuada de agua a un disolvente seco. El fluoruro puede producirse en solución acuosa y, en este caso, puede obtenerse una solución de fluoruro que tiene el contenido de agua deseado, mediante adiciones repetidas del disolvente, seguido de evaporación de la mezcla disolvente/agua, o por dilución de fluoruro acuoso con el disolvente orgánico deseado. El contenido de agua del disolvente puede reducirse también usando una resina de depuración, tal como una resina de poliestireno funcionalizada, por ejemplo, un epóxido, metilisocianato, o resina funcionalizada con anhídrido de ácido, para retirar el agua de la solución de fluoruro. Las resinas adecuadas están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Novabiochem. El rendimiento de la resina de depuración puede mejorarse usando un catalizador adecuado, por ejemplo, 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP).

En esta realización, la etapa de secado puede realizarse mezclando la resina de depuración con la solución de fluoruro en un recipiente y, después, separando la resina de depuración por filtración. Como alternativa, y particularmente adecuadamente cuando la resina de depuración se usa dentro de un aparato de síntesis automatizado, la resina de depuración puede estar contenida en un recipiente, a través del cual se hace pasar la solución de fluoruro. La solución de fluoruro puede hacerse pasar a través de la resina de depuración como un flujo continuo, por ejemplo, a un caudal de 0,1 ml/min a 100 ml/min, o en lotes, tal como para permitir un tiempo de residencia suficiente sobre la resina de depuración para que ocurra el secado.

ES 2 347 165 T3

La reacción puede realizarse en fase solución o, como alternativa, el derivado de tetraacetil manosa puede unirse a un soporte sólido para formar una resina-engarce-vector (RLV) de fórmula (I):

SOPORTE SÓLIDO-ENGARCE-derivado de tetraacetil manosa (I)

en el que

el soporte sólido es cualquier soporte sólido;

el derivado de tetraacetil manosa es como se ha definido anteriormente;

X es un grupo que promueve la sustitución nucleófila en un sitio específico en el derivado de tetraacetil manosa, por ejemplo, $-\text{SO}_2\text{O}-$;

el engarce es cualquier grupo orgánico adecuado que sirva para espaciar el sitio reactivo suficientemente de la estructura del soporte sólido, tal como para maximizar la reactividad; por ejemplo, de cero a cuatro grupos arilo (por ejemplo, fenilo) y/o una cadena de alquilo o haloalquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ (especialmente, fluoroalquilo) y, opcionalmente, de uno a cuatro grupos funcionales adicionales, tales como grupos amida o sulfonamida.

Los sistemas RLV se analizan ampliamente en el documento WO-A-03/002157, que también da detalles de engarces adecuados.

El RLV de fórmula (I) se pone en contacto con una solución del fluoruro, dando como resultado el desplazamiento del azúcar del soporte sólido, para dar un derivado de glucosa fluorado, protegido.

Los soportes sólidos adecuados se analizan también en el documento WO-A-03/002157, e incluyen polímeros tales como poliestireno (que puede estar injertado en bloques, por ejemplo, con polietilenglicol), poliacrilamida, polipropileno o revestido con vidrio o sílice con dicho polímero. Como alternativa, puede usarse una resina, por ejemplo, como se detalla en el documento WO-A-03/002157. El soporte sólido puede estar en forma de partículas discretas pequeñas, tal como perlas o gránulos, o como un revestimiento sobre la superficie interna de un cartucho o un recipiente microfabricado. La realización del procedimiento de la invención sobre un soporte sólido posibilita que el producto se obtenga en forma pura, sin necesidad de ninguna etapa de separación adicional. Esto es especialmente ventajoso cuando la fluoración es una radiofluoración, puesto que cualquier tiempo que se ahorre en el procedimiento da como resultado un rendimiento radioquímico no corregido mayor.

La reacción normalmente se realiza a una temperatura de 5°C a 180°C , aunque particularmente de 75°C a 125°C .

El procedimiento de la presente invención puede realizarse como parte de una síntesis automatizada. Este es el caso si la reacción tiene lugar en solución, o si el derivado de tetraacetil manosa se une a una fase sólida.

El fluoruro que se hace reaccionar con el derivado de tetraacetil manosa puede ser un compuesto iónico, y puede estar provisto de cualquier contraión. Es importante, sin embargo, que el contraión sea suficientemente soluble en el disolvente de reacción para mantener la solubilidad del fluoruro. Por lo tanto, los contraiones adecuados incluyen iones metálicos grandes, aunque blandos, tales como rubidio o cesio o, como alternativa, iones no metálicos tales como tetraalquilamonio y tetraalquilfosfonio. Los iones potasio pueden usarse también como contraiones, en cuyo caso, para aumentar la reactividad del fluoruro, puede añadirse un catalizador de transferencia de fase, tal como 4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo-[8,8,8]-hexacosano (comercializado con la marca comercial KryptofixTM 2.2.2), para solubilizar la sal potásica en disolventes orgánicos.

El procedimiento de la presente invención es muy adecuado para la producción de derivados radiomarcados, particularmente derivados marcados con ^{18}F y, por lo tanto, el fluoruro puede comprender un ión ^{18}F -fluoruro.

Como se ha analizado previamente anteriormente, el ión ^{18}F -fluoruro puede prepararse mediante la irradiación de una diana de ^{18}O -agua y ésta puede ser una etapa inicial en el procedimiento de la invención

El procedimiento de la presente invención es particularmente útil para producir derivados de azúcar radiofluorados, tales como ^{18}F -pFDG, que pueden desprotegerse después para dar compuestos tales como ^{18}F -FDG, un trazador para PET bien conocido. La desprotección puede ser una etapa adicional en el procedimiento. Cuando el grupo protector en el producto de azúcar fluorado es un éster, por ejemplo, un derivado de acetilo, la desprotección puede conseguirse mediante hidrólisis con ácido o base.

Otras etapas adicionales incluyen la retirada del exceso de ^{18}F -fluoruro de la solución, y la retirada del disolvente orgánico. El exceso de ^{18}F -fluoruro puede retirarse por cualquier procedimiento convencional, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio de iones o absorbentes en fase sólida. Las resinas de intercambio de iones adecuadas incluyen BIO-RAD AG 1-X8TM y Waters QMATM y los absorbentes en fase sólida adecuados incluyen alúmina.

ES 2 347 165 T3

El disolvente orgánico puede retirarse por evaporación a temperatura elevada al vacío o haciendo pasar una corriente de gas inerte, tal como nitrógeno o argón, sobre la solución.

5 El compuesto trazador de [¹⁸F], que es el producto final de estas etapas, puede formularse para administración a un paciente, por ejemplo, como una solución acuosa que puede prepararse disolviendo el trazador marcado con [¹⁸F] en solución salina isotónica, estéril, que puede contener hasta un 10% de un disolvente orgánico adecuado, tal como etanol o, como alternativa, en una solución tamponada adecuada, tal como tampón fosfato. Pueden usarse otros aditivos, por ejemplo, ácido ascórbico, que reduce la radiólisis.

10 Como ya se ha mencionado, un compuesto particularmente preferido que puede prepararse mediante el procedimiento de la invención es [¹⁸F]-pFDG y, por lo tanto, en un segundo aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para la preparación de [¹⁸F]-pFDG, comprendiendo el procedimiento hacer reaccionar triflato de tetraacetil manosa con [¹⁸F]-fluoruro, caracterizado porque el fluoruro se disuelve en un disolvente que contiene agua, en una cantidad mayor de 1000 ppm y menor de 50.000 ppm. En una realización de este aspecto de la invención, se hace reaccionar triflato de tetraacetil manosa (1 equivalente) con [¹⁸F]-fluoruro en presencia de Kryptofix™ 2.2.2 (de 0,9 a 1,1 equivalentes molares, adecuadamente de 0,98 a 0,99 equivalentes molares), carbonato potásico (de 0,4 a 0,6 equivalentes molares, adecuadamente de 0,50 a 0,60 equivalentes molares), en acetonitrilo que contiene agua, en una cantidad mayor de 1000 ppm y menor de 50.000 ppm.

20 Las características preferidas de la invención son como se han detallado anteriormente para el primer aspecto. En particular, el procedimiento puede comprender la etapa inicial de producir el [¹⁸F]-fluoruro irradiando una diana de [¹⁸O]-agua y una etapa adicional de convertir el [¹⁸F]-pFDG en [¹⁸F]-FDG mediante hidrólisis ácida o alcalina.

25 La invención se describirá ahora con mayor detalle con referencia a los ejemplos y los dibujos, en los que:

La Figura 1 es una representación que muestra la correlación de la pureza radioquímica de un producto [¹⁸F]-pFDG, con el contenido de agua del disolvente.

30 La Figura 2 es un gráfico que muestra la correlación entre la formación de [¹⁸F]-pFDG y pGlucosa durante el procedimiento de marcaje con resina-engarce-vector.

La Figura 3 es una representación que muestra la correlación de la pureza radioquímica de un producto [¹⁸F]-pFDG en una síntesis automatizada, con el contenido de agua del disolvente.

35 Ejemplo 1

Efecto de la variación del contenido de agua sobre el marcaje con ¹⁸F de azúcares

40 En este ejemplo, se usaron tres procedimientos diferentes para marcar un azúcar con ¹⁸F y el efecto se evaluó de la variación del contenido de agua de la mezcla de reacción.

a) *Marcaje de resina-engarce-vector (RLV)*

45 El ¹⁸F se introdujo en el Tracerlab MX™ y se secó usando el procedimiento de secado convencional usado en la producción de 2-[¹⁸F]fluoro-2-desoxiglucosa. Se usaron Kryptofix™ 2.2.2/carbonato potásico para solubilizar el fluoruro en acetonitrilo. Tras completarse el procedimiento de secado, seguido de disolución del fluoruro en acetonitrilo, se tomó una muestra del ¹⁸F secado en acetonitrilo, para análisis del contenido de agua, y se midió en un medidor de valoración Karl Fisher. Cuando fue necesario, se introdujeron adiciones extra de agua para llevar el contenido de agua por encima del obtenido normalmente por el procedimiento de secado.

50 Un cartucho Hi Trap® de 1 ml se llenó con aproximadamente 370 mg de un precursor de manosa protegida, unido, en fase sólida, a una sustitución de 0,003 mmol/g. Un extremo del cartucho se conectó a través de un bucle a un activador de jeringa. El otro extremo del cartucho se conectó después a un vial lleno con N₂, equipado con una purga de tamiz molecular. Después, se usó una pistola de aire caliente para calentar el cartucho a una temperatura del cartucho externo de 80°C.

60 Después, se inyectaron 6 x 0,5 ml de acetonitrilo seco a través del sistema, para lavar cualquier impureza y el agua (presente de forma natural en la resina debido, por ejemplo, a un secado incompleto) y el acetonitrilo se desechó después. El vial auto-muestreador, que contenía la solución de ¹⁸F secado (450 μl), se instaló en el aparato en su sitio. El activador de jeringa movió entonces el fluoruro secado hacia atrás y hacia delante, a un caudal de 180 μl/min durante 5 ciclos. El fluoruro secado reaccionó con el precursor de manosa en fase sólida, liberando un derivado de [¹⁸F]-2-desoxi glucosa protegido (que, después de la desprotección, da 2-[¹⁸F]-2-desoxiglucosa).

65 Se tomó una muestra de 5 μl del vial auto-muestreador para análisis por cromatografía en capa fina (CCF) y se salpicó sobre una placa de gel de sílice 60 F254 y después se ensayó en un disolvente de acetonitrilo/agua, preparado a una proporción 90/10. La pureza radioquímica se estableció en un Perkin Elmer Instant Imager.

ES 2 347 165 T3

b) *Marcaje de triflato de tetraacetil manosa*

Se preparó una solución de 32 mg de K_2CO_3 , disuelta en 600 μ l de H_2O de calidad para HPLC, más 150 mg de Kryptofix™ 2.2.2 disuelto en 2,5 ml de acetonitrilo. Se añadieron 0,6 ml de ésta a un reactor de carbono vítreo, junto con aproximadamente 40 MBq de ^{18}F en agua enriquecida con ^{18}O . El controlador del calentador se ajustó a 95°C y el recipiente de reacción se calentó durante un total de 35 minutos para secar el fluoruro. El agua y el acetonitrilo se evaporaron en un flujo de nitrógeno.

Se inyectó 1 ml de acetonitrilo, tres veces en total, a intervalos de 2 minutos, para facilitar la retirada azeotrópica del agua del fluoruro, siendo la primera adición 20 minutos en el procedimiento de secado. A los 35 minutos se desconectó el calentador y el recipiente de reacción se enfrió mediante un flujo de aire comprimido, externo al recipiente de reacción, a aproximadamente 45°C.

Después, se añadieron 25 mg de triflato de manosa en 2,0 ml de CH_3CN al fluoruro secado, seguido de mezcla. El controlador del calentador se ajustó a 85°C. 2 minutos después de alcanzar la temperatura ajustada, se obtuvo una muestra para análisis por CCF.

El calentador se conectó y el recipiente de reacción se refrigeró mediante un flujo de aire comprimido a aproximadamente 45°C.

La muestra para el análisis por CCF se salpicó sobre una tira de gel de sílice y después se ensayó en un disolvente de acetonitrilo/agua, preparado a una proporción de 95/5. La pureza radioquímica se estableció en un Perkin Elmer Instant Imager. La parte superior del recipiente de reacción se retiró después y se tomaron 50 μ l de muestra para el análisis del contenido de agua en un medidor de valoración Karl Fisher.

c) *Marcaje automatizado*

El marcaje se realizó en una plataforma de síntesis automatizada prototipo que comprendía 25 válvulas de tres vías, con un recipiente de reactor calentado en su interior, y un módulo de polipropileno desechable. La trayectoria del fluido en el módulo permite también la purificación por SPE de los intermedios o el producto final.

El fluoruro quedó atrapado inicialmente en un cartucho QMA y se eluyó con una solución de 20 mg de Kryptofix™ 2.2.2, 4,1 mg de K_2CO_3 , 320 μ l de CH_3CN , 80 μ l de H_2O . Esto se secó después a 105°C/120°C, durante aproximadamente 6 minutos, en una corriente de nitrógeno y se redisolvió en 1,5 ml de aproximadamente 20 mg/ml de triflato de tetraacetil manosa en acetonitrilo.

La reacción de marcaje se realizó a una temperatura de marcaje de 105 o 125°C, con tiempos de reacción a 90 ó 270 segundos. Después del marcaje, la 2[^{18}F]-2-desoxiglucosa se analizó por CCF. La placa de CCF era un gel sílice 60 F254 que empleaba un 95% de acetonitrilo y un 5% de agua como disolvente de revelado. La pureza radioquímica se estableció en un Perkin Elmer Instant Imager.

Los resultados de los tres experimentos del Ejemplo 1 se muestran en la Figura 1, a partir de la cual puede verse que la pureza radioquímica del producto era relativamente baja cuando el contenido de agua de la mezcla de reacción estaba por debajo de 1000 ppm, pero que mejoraba en gran medida cuando el contenido de agua estaba entre 1000 y 5000 ppm. La representación muestra que los niveles óptimos de agua en el disolvente estaban entre aproximadamente 2000 y 7000 ppm.

Ejemplo 2

Correlación entre la formación de un [^{18}F]-pFDG y pGlucosa durante el procedimiento de marcaje

El marcaje con 18-fluoruro de RLV se consiguió en acetonitrilo en presencia de Kryptofix™ 2.2.2, carbonato potásico y cantidades variables de agua. Tras el marcaje, la mezcla resultante se sometió a HPLC en fase inversa, ejecutando un gradiente de disolvente A al 90%: disolvente B al 10% (disolvente A = solución de ácido trifluoroacético al 0,1% en agua; disolvente B = solución de ácido trifluoroacético al 0,1% en acetonitrilo) hasta A al 5%, B al 95%, durante 10 minutos a 1 ml/min, y usando una columna C_{18} Phenomenex Luna de 5 μ m (4,6 mm x 150 mm). La integración de los picos que identificaban la glucosa protegida a un tiempo de retención de 3 minutos y FDG protegido a los 6,6 minutos (debido principalmente a la presencia de [^{19}F]-FDG, que será proporcional a [^{18}F]-FDG) se determinaron y correlacionaron.

Generalmente, se cree que la presencia de grandes cantidades de agua en la mezcla de reacción da como resultado la formación de grandes cantidades de glucosa protegida (en lugar de [^{18}F]-pFDG) como resultado del desplazamiento nucleófilo en el grupo triflato. De esta manera, sería de esperar que un gráfico que represente la concentración de [^{18}F]-pFDG frente a la concentración del derivado de glucosa protegido en la mezcla de productos, tuviera una pendiente negativa, produciendo un alto contenido de agua altos niveles de glucosa protegida y bajos niveles de [^{18}F]-pFDG.

ES 2 347 165 T3

Sin embargo, a partir de estudios de marcaje sobre triflato de tetraacetil manosa unido a una resina, se estableció que hay una buena correlación positiva (véase la Figura 2) entre los dos picos de HPLC. Esto indica que cuando está presente una alta concentración de agua, ésta inhibe la formación de ambos productos.

5 Ejemplo 3

Síntesis automatizada de de 1,3,4,6,-tetra-O-acetil-2-fluoro-β-D-manopiranososa

10 Tomar muestras de la mezcla de reacción radiactiva al inicio del procedimiento de marcaje fue problemático. Por lo tanto, el contenido de agua se midió al final de la reacción de marcaje, junto con el RCP (medido por CCFI). El contenido de agua al inicio del procedimiento de marcaje se calculó después factorizando la retención de agua, como se describe más adelante.

15 *Experimento de radiomarcaje*

La síntesis de 1,3,4,6,-tetra-O-acetil-2-fluoro-β-D-manopiranososa se consiguió en un sintetizador automatizado, diseñado para la fijación de un módulo desechable de un solo uso. Este módulo comprende un módulo desechable de 25 válvulas, que comprende diversos viales que contienen reactivo, junto con jeringas y espacio para cartuchos de extracción en fase sólida.

Se ejecutó una secuencia de síntesis que atrapó aproximadamente 50 MBq de 18-fluoruro en 2 ml de agua en un cartucho Waters Access PlusQMA (en su forma carbonato) y después se eluyó el cartucho con una solución de kryptofix y carbonato en acetonitrilo/agua (kryptofix 222-20,3 mg, carbonato potásico-4,3 mg, acetonitrilo-320 μl, agua-80 μl) en un reactor calentado. Esto se secó calentando en una corriente de nitrógeno seco y, después, una solución de triflato de manosa en acetonitrilo, a contenidos de agua definidos, se añadió al reactor.

Se permitió que la reacción transcurriera durante 80 segundos más, con una temperatura del calentador externo de 125°C, después se extrajeron 0,6 ml y se desecharon como residuo (para retirar cualquier agua residual de las líneas) y el resto se transfirió al vial del producto. El contenido de agua del vial del producto se determinó por valoración de Karl Fisher usando 50 μl de solución y el RCP se midió mediante cromatografía en capa fina instantánea (CCFI). La CCF se realizó en placas de CCF de sílice, eluyendo las manchas con 95% de acetonitrilo, 5% de agua y midiendo después la proporción relativa de 18-fluoruro y 1,3,4,6,-tetra-O-acetil-2-fluoro-β-D-manopiranososa (en todos los casos, los dos únicos componentes), usando CCFI.

35 *Medición de la retención de agua*

Se realizaron tres ensayos en frío, en los que un volumen definido del líquido del reactor se muestreó, tanto antes como después del marcaje, para ver cuánta agua se había perdido a través de la reacción con triflato de manosa. Esto hizo posible factorizar la retención de agua en los contenidos de agua medidos.

Se ejecutó una secuencia de síntesis análoga al experimento de radiomarcaje, en la que 2 ml de agua se hicieron pasar a través de un cartucho Waters Access PlusQMA (en su forma carbonato) y, después, el cartucho se eluyó con una solución de kryptofix y carbonato en acetonitrilo/agua (kryptofix 222-20,3 mg, carbonato potásico-4,3 mg, acetonitrilo-320 μl, agua-80 μl) en un reactor calentado. Esto se secó calentando en una corriente de nitrógeno seco y, después, una solución de triflato de manosa en acetonitrilo a contenidos de agua definidos, se añadió al reactor.

Tan pronto como la solución de triflato de manosa se hubo añadido al reactor, se extrajeron 0,6 ml y se inyectaron a un vial de producto. Se permitió entonces que la reacción de marcaje transcurriera durante 80 segundos más a una temperatura del calentador externo de 125°C, después el resto de la solución se extrajo y se transfirió a un vial de producto diferente. El contenido de agua para cada vial se midió usando un valorador de Karl Fisher usando 50 μl de solución.

Los resultados de los ensayos de retención de agua se muestran en la Tabla 1, que muestra los niveles de agua presentes en el disolvente acetonitrilo:

TABLA 1

60	Pre marcaje/ppm	Post marcaje/ppm
	786	802
	2603	2527
65	8433	7860

ES 2 347 165 T3

A niveles bajos y medios de agua no hubo una retención significativa de agua debida a la reacción con triflato de manosa. Sin embargo, a niveles de agua mayores hubo aproximadamente una disminución del 7% en el contenido de agua.

5 Resultados del radiomarcaje

Se midió el contenido de agua de cada reacción de radiomarcaje y, después, se ajustó factorizando el agua retenida por el triflato de manosa, para proporcionar un contenido de agua previo al marcate. El RCP obtenido para cada contenido de agua se da en la Tabla 2 y se ilustra en la Figura 3.

TABLA 2

ppm de agua pre-marcaje (calculado)	% de RCP
506	94,6%
707	91,4%
2803	97,6%
3855	95,9%
4114	96,7%
5779	98,4%
5943	94,1%
7980	85,6%
9206	73,6%
15382	85,0%
43375	85,5%

Estos resultados soportan un contenido de agua preferido de 3000 a 6000 ppm. Ignorando el resultado engañoso a 73,6% de RCP, la reacción tiende a formar una asíntota alrededor del 85% de RCP, incluso cuando las condiciones de reacción son muy húmedas.

ES 2 347 165 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para la preparación de un derivado de glucosa fluorado, protegido, comprendiendo el procedimiento hacer reaccionar un derivado de tetraacetil manosa con un fluoruro, **caracterizado** porque la reacción se realiza en un disolvente que contiene agua, en una cantidad mayor de 1000 ppm y menor de 50.000 ppm.

10 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, para la preparación de 2-fluoro-1,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucosa (tetraacetilfluoro-glucosa o pFDG) a partir de 1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-trifluorometanosulfonil- β -D-manopiranos (triflato de tetraacetil manosa).

3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que el disolvente se selecciona entre acetonitrilo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano, dioxano, 1,2-dimetoxietano, sulfolano y *N*-metilpirrolidinona.

15 4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el disolvente es acetonitrilo.

5. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el contenido de agua del disolvente es de 1000 a 15.000 ppm.

20 6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el contenido de agua del disolvente es de 2000 a 7000 ppm.

7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el contenido de agua del disolvente es de 3000 ppm a 6000 ppm.

25 8. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que se realiza en fase solución.

9. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que está automatizado.

30 10. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el fluoruro es un fluoruro iónico con un contraión potasio y un catalizador de transferencia de fase, tal como 4,7,13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo-[8,8,8]-hexacosano, se añade al fluoruro.

35 11. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para la preparación de un derivado de azúcar radiofluorado.

12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el derivado de azúcar radiofluorado es un derivado de azúcar marcado con [^{18}F].

40 13. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para la preparación de [^{18}F]-pFDG, comprendiendo el procedimiento hacer reaccionar triflato de tetraacetil manosa con [^{18}F]-fluoruro.

14. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende adicionalmente, en cualquier orden, una o más etapas adicionales de:

45 i. retirar el exceso de fluoruro de la solución;

ii. desproteger el derivado de azúcar fluorado, protegido, para dar un derivado de azúcar fluorado, desprotegido;

50 iii. retirar el disolvente orgánico; y

iv. formular el derivado de azúcar fluorado, desprotegido, en solución acuosa.

55

60

65

FIGURA 1

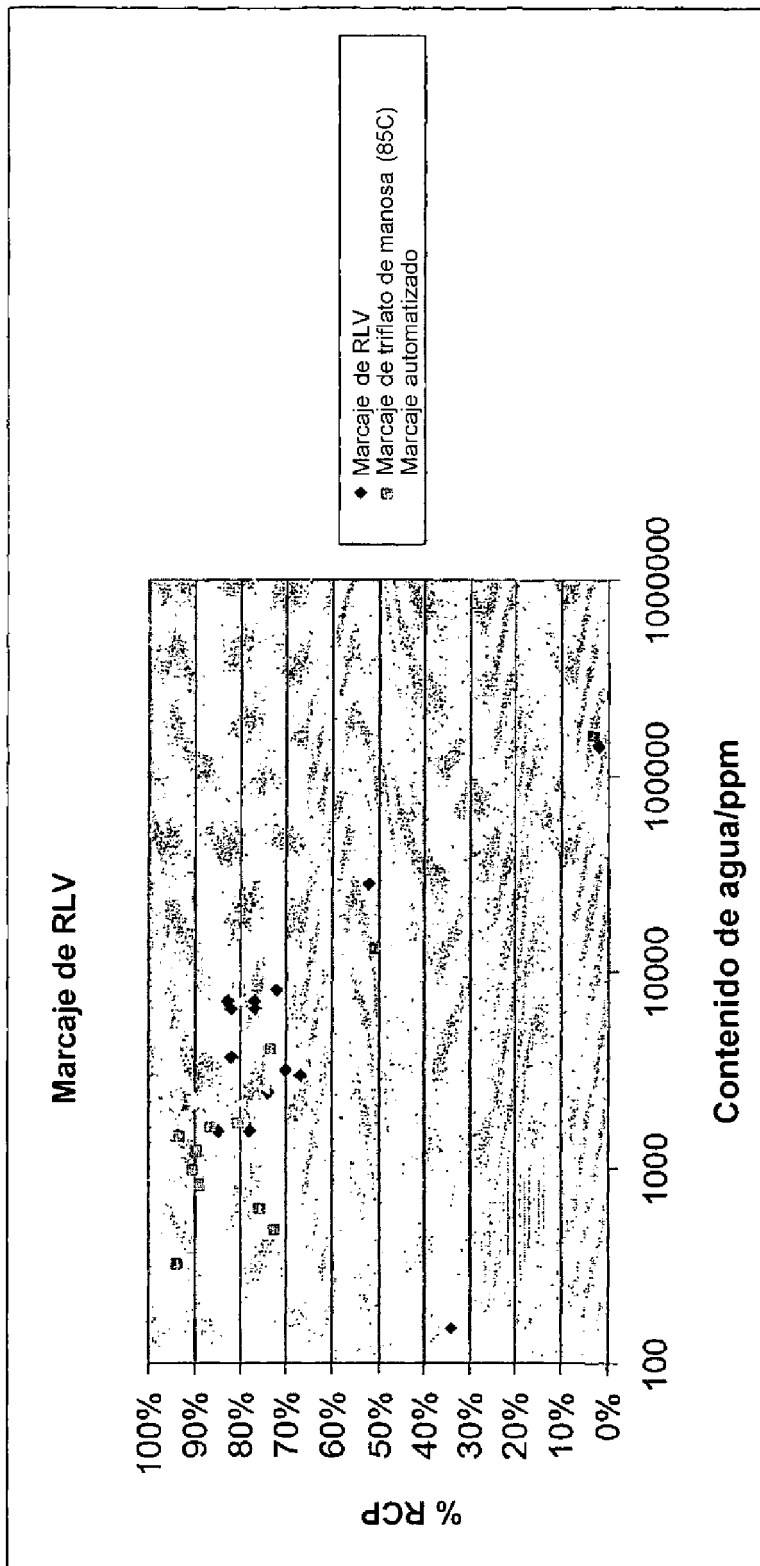


FIGURA 2

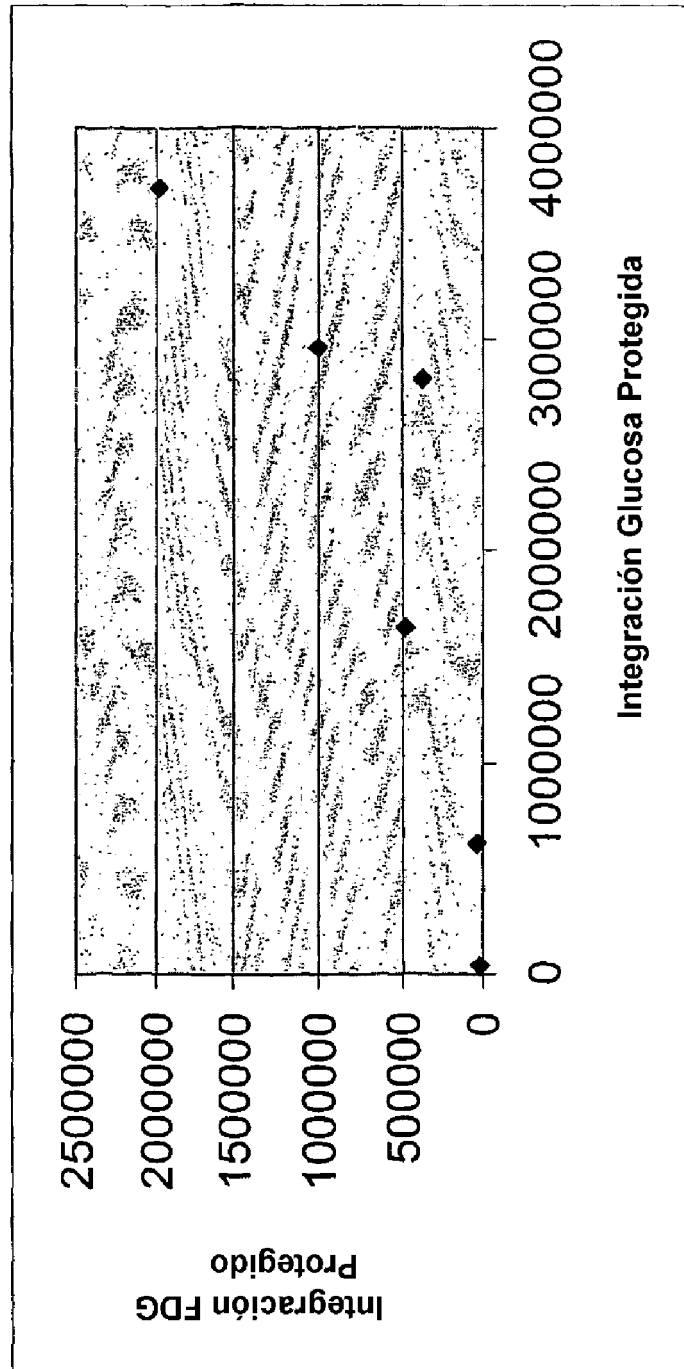


Figura 3

