

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 495**

51 Int. Cl.:
G01N 33/534 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06751892 .8**
96 Fecha de presentación: **27.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1875239**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.01.2008**

54 Título: **UN MÉTODO PARA LA PREPARACIÓN DE SONDAS PARA LA FORMACIÓN DE IMÁGENES UTILIZANDO QUÍMICA CLIC.**

30 Prioridad:
27.04.2005 US 675290 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2012

73 Titular/es:
**SIEMENS MEDICAL SOLUTIONS USA, INC.
51, VALLEY STREAM PARKWAY
MALVERN, PA 19355-1406, US**

72 Inventor/es:
**KOLB, Hartmuth, C.;
MOCHARLA, Vani, P. y
WALSH, Joseph, C.**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 375 495 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

Un método para la preparación de sondas para la formación de imágenes utilizando química clic.

Campo de la invención

5 La invención se relaciona con el uso de métodos de química clic *in situ* para cribado de sondas para la formación de imágenes moleculares de alta afinidad

Antecedentes de la invención

10 La Tomografía de Emisión de Positrones (PET) es una tecnología molecular de formación de imágenes que es cada vez más utilizada para la detección de enfermedades. Los sistemas de formación de imágenes por PET crean imágenes con base en la distribución de isótopos que emiten positrones en el tejido de un paciente. Típicamente se administran los isótopos a un paciente por medio de la inyección de moléculas sonda que incluyen un isótopo que emite positrones, tal como F-18, C-11, N-13, u O-15, covalentemente unido a una molécula que es fácilmente metabolizada o localizada en el organismo (por ejemplo glucosa) o que se enlaza químicamente sitios receptores dentro del organismo. En algunos casos, se administra el isótopo al paciente como una solución iónica o por medio de inhalación. Una de las sondas más ampliamente utilizadas para la formación de imágenes moleculares por PET
15 marcada con un emisor de positrones es la 2-desoxi-2-¹⁸F]fluoro-D-glucosa (¹⁸F]FDG).

20 El cribado por PET utilizando el análogo de glucosa (¹⁸F]FDG), que ante todo dirige a los transportadores de glucosa, es una herramienta clínica precisa para la detección temprana, determinación del estado, y nueva determinación del estado del cáncer. Se está utilizando cada vez más la formación de imágenes por PET-FDG para controlar la quimioterapia y la quimiorradioterapia contra el cáncer debido a que se ha demostrado que cambios tempranos en la utilización de la glucosa están relacionados con predicciones de los resultados. Un rasgo característico de las células tumorales es su acelerada tasa de glicólisis, que resulta de las altas demandas metabólicas de tejidos tumorales en rápida proliferación. Como la glucosa, la FDG es consumida por las células cancerosas a través de transportadores de glucosa y es fosforilada por hexoquinasa hasta FDG-6 fosfato. Esta última no puede seguir más adelante en la cadena de la glicólisis, o deja la célula debido a su carga, permitiendo
25 detectar las células con altas tasas de glicólisis.

30 Aunque útil en muchos contextos, también existen limitaciones en la formación de imágenes por FDG-PET para monitoreo del cáncer. La acumulación en tejido inflamatorio limita la especificidad de FDG-PET. Contrariamente, el consumo no específico de FDG puede limitar también la sensibilidad de PET para la predicción de la respuesta por parte del tumor. Se ha demostrado que las reacciones de estrés celular inducidas por la terapia causan un incremento temporal en el consumo de FDG en líneas de células tumorales tratadas por medio de radioterapia y de fármacos quimioterapéuticos. Además, la actividad fisiológica de fondo altamente normal (es decir, en el cerebro) puede hacer que la cuantificación del consumo de FDG relacionada con el cáncer sea imposible en algunas áreas del organismo.

35 Debido a estas limitaciones, se están desarrollando otros trazadores para la formación de imágenes por PET que apuntan a otras transformaciones medianas por una enzima en tejido canceroso, tales como 6-[F-18]fluoro-L-DOPA para síntesis de dopamina, 3'-[F-18]Fluoro-3'-desoxitimidina (FLT) para replicación del ADN, y [C-11](metil)colina para colina quinasa, así como actividad específica ultra alta de enlazamiento del receptor-ligando (por ejemplo, 16 α [F-18]fluoroestradiol) y potencialmente expresión génica (por ejemplo, [F-18]fluoro-ganciclovir). Los agentes dirigidos molecularmente han demostrado un gran valor potencial para la formación no invasiva de imágenes por PET en
40 cánceres.

45 Estos estudios han demostrado el gran valor de la formación de imágenes no invasivas por PET para objetivos metabólicos específicos del cáncer. A pesar del claro valor clínico de la incorporación de la formación de imágenes por PET en el manejo de un paciente, existen limitaciones. En ciertos casos, las sondas actuales para formación de imágenes carecen de especificidad o tienen características inadecuadas de señal con respecto al fondo. Además, nuevos objetivos biológicos que están siendo analizados para intervención terapéutica requerirán de nuevas sondas para formación de imágenes para evaluar el potencial terapéutico.

50 Se requieren biomarcadores adicionales que muestren una afinidad muy alta hacia, y específicamente para, objetivos tumorales para soportar el desarrollo de fármacos para el cáncer y para proporcionarle a los proveedores que atienden la salud medios para diagnosticar en forma precisa una enfermedad y monitorear el tratamiento. Tales sondas para formación de imágenes podrían mejorar dramáticamente la resolución espacial aparente del escáner para PET, permitiendo detectar tumores más pequeños, y cantidades en nanomoles que son inyectadas en pacientes.

55 Krasinsky et al. (2005) JACS 127, 6686 - 6692 divulga un proceso para la identificación de un inhibidor para acetilcolinesterasa (AChE), que comprende la reacción de AChE con un primer ligando (TZ2), poniendo en contacto al complejo con una biblioteca para la selección *in situ* de un segundo ligando, y acoplando el primero y el segundo ligandos utilizando química clic. Manetsch et al. (2004) JACS 126, 12809 - 12818, describe un método *in situ* para la

identificación de inhibidores de enzimas que comprende poner en contacto a la AChE con una primera biblioteca de ligandos (TZ2-6, TA1-3), poner en contacto el complejo con una segunda biblioteca de ligandos (PA2-5, PZ5-8), permitiendo que tenga lugar una reacción clic entre miembros de la primera y la segunda biblioteca, e identificando los productos formados. EP 0167103 A divulga la preparación de compuestos que contiene ^{18}F para uso en PET, que comprende la transformación de un compuesto de fórmula X-R en ^{18}F -R, en donde X es un grupo nucleofílico saliente, tal como un grupo halo o nitro.

Resumen de la invención

La presente invención provee una plataforma tecnológica con base en un enfoque de química clic *in situ* (Mocharla, V. P.; Colasson, B.; Lee, L. V.; Roeper, S.; Sharpless, K. B.; Wong, C.-H.; Kolb, H. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 116 - 120) para identificar sondas de PET de alta afinidad que apuntan a macromoléculas biológicas relacionadas con cáncer y con otras enfermedades. Los ligandos de alta afinidad para objetivos biológicos se elaboran a través de química clic *in situ*, por medio de la cual el objetivo biológico patroniza el montaje de dos fragmentos reactivos dentro de los confines de sus bolsillos de enlazamiento. La marcación radioactiva de los ligandos objetivo generados provee sondas candidatas para la formación de imágenes por PET que pueden permitir el diagnóstico y la identificación de la ubicación del tumor, y puede proveer información del mecanismo sobre el tipo de tumor para tratamiento. Al menos uno de los fragmentos pareados utilizados en el proceso de selección porta un isótopo no radioactivo de un elemento (o elemento químico) que incluye un isótopo radioactivo dentro de su núcleo que es adecuado para uso en sondas para formación de imágenes moleculares (por ejemplo, F-19) como parte de su diseño con el propósito de facilitar la introducción posterior del radionúclido (por ejemplo, F-18).

En una modalidad, la presente invención identifica una nueva clase de sondas de formación de imágenes moleculares para Anhidrasa carbónica II (CA-II). Fisiológicamente, CA-II es una de las 14 isozimas conocidas de la familia de la anhidrasa carbónica y se expresa en casi cada órgano y tejido en el organismo. Esto es claramente una reflexión sobre la importancia de su capacidad para catalizar la hidratación reversible del dióxido de carbono en ion bicarbonato. Esta función biológica crítica hace de la CA-II una pieza clave en los procesos que involucran el transporte de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ entre tejidos, control del pH, reabsorción ósea y secreción de electrolitos en diferentes epitelios. Hay otros miembros de la familia de CA, específicamente las isozimas CA-IX y CA-XII, que se reporta que son sobreexpresadas en células cancerosas. Aplicando adicionalmente esta tecnología de selección para la identificación de nuevos agentes para formación de imágenes CA-IX y CA-XII, se puede formar exitosamente imágenes de tumores que expresen CA-IX y CA-XII y pueden conducir en última instancia a la identificación y nuevas terapéuticas y regímenes de terapia.

En otra modalidad, se aplicó también la plataforma de selección para la identificación de nuevos radioligandos de ciclooxigenasa-2 (COX-2) que portan triazol que pueden ser utilizados para la formación de imágenes de la expresión de COX-2 *in vivo*. COX-2, un miembro inducible de la familia de COX que cataliza la producción de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico, es altamente expresado en tejidos inflamados. Después del descubrimiento de COX-2, una nueva clase de fármacos antiinflamatorios no esteroideos específicos COX-2 (NSAIDS) proporcionaron terapia para enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios mediados por COX-2, siendo la artritis reumatoide la más común. Debido a que estos inhibidores específicos de COX-2 dirigen selectivamente a COX-2 y no a COX-1, los efectos secundarios comunes asociados con la terapia tradicional relacionada con NSAID, tales como sangrado gástrico, no están presentes. Aunque la nueva terapia con COX-2 no está asociada con los efectos secundarios que inhiben a COX-1, los compuestos terapéuticos con base en COX-2 han recibido mucha atención como resultado de supuestos problemas cardiovasculares asociados con el uso terapéutico de Rofecoxib (Vioxx®). A partir de un punto de vista para la formación de imágenes *in vivo*, el monitoreo de la farmacodinamia de compuestos con efectos secundarios sin explicación, tales como los inhibidores de COX-2, puede dar una idea y una dirección para el desarrollo de compuestos terapéuticos más seguros.

En otra modalidad, se utiliza el método de selección para identificar sondas para la formación de imágenes moleculares derivadas de una variedad de biomacromoléculas tales como enzimas, receptores, ADN, ARN y anticuerpos. Cuando estas biomacromoléculas son sobreexpresadas o sobreactivadas *in vivo*, son detectadas a través de su enlazamiento con la sonda para formación de imágenes moleculares. Por ejemplo, la formación de imágenes *in vivo* de tejidos que expresan niveles altos de anhidrasa carbónica II (CA-II) (por ejemplo, glóbulos rojos) puede ser lograda por medio de la administración de un radioligando de CA-II de alta afinidad, identificado por medio de este proceso de selección. En otra modalidad, también se puede aplicar la tecnología de selección para identificación de tumores que expresan en gran medida biomacromoléculas firma. Por ejemplo, en el área de formación de imágenes de oncología, los radioligandos que apuntan específicamente a proteínas oncogénicas de la familia de la quinasa pueden conducir a la detección de un fenotipo tumoral específico. Se prefieren particularmente las quinasas objetivo pertenecientes a la ruta de señalización de la PI-3-Quinasa/AKT (PI-3-quinasa: Fosfoinositol 3-quinasa; Akt: Proteína Quinasa B), que se relacionan con la supervivencia de las células en el cáncer. Por ejemplo, la quinasa Akt es un nodo clave en la transformación oncogénica de las células, convirtiéndola en un objetivo clave para el desarrollo de sondas para la formación de imágenes que penetran células y buscan Akt activadas con alta especificidad y afinidad.

En una modalidad, el método de selección involucra la identificación de una pluralidad de moléculas que pueden exhibir afinidad por el sitio de enlazamiento de la enzima y la unión covalente de un isótopo no radioactivo de un elemento (por ejemplo, F-19) que incluye al menos un isótopo radioactivo en su núcleo (por ejemplo, F-18) con la molécula. Un grupo funcional capaz de participar en una reacción de química clic, tal como un grupo azida un grupo alquínico, está unido también a la molécula, opcionalmente a través de un enlazador o enlazadores. Los miembros individuales de la pluralidad resultante de moléculas son luego mezclados con la molécula objetivo y los miembros individuales de una pluralidad o biblioteca de compuestos que pueden exhibir afinidad por un sitio de enlazamiento de sustrato de la enzima. Los miembros de la biblioteca de enlazamiento de sustrato han sido químicamente modificados para incluir un grupo funcional de química clic compatible con el grupo funcional de la biblioteca de moléculas de fragmento clic complementario. En una modalidad particular, cualquier par de compuestos, uno de cada biblioteca, que exhibe afinidad por los dos sitios de enlazamiento escogidos de la quinasa objetivo se enlazará en forma covalente a través de los grupos funcionales de la química clic *in situ*. Estos ligandos se identifican por medio de métodos conocidos tales como espectrometría de masas para monitoreo de un ion seleccionado (SIM/MS). Después de la síntesis química de estos compuestos, se ensayan, utilizando técnicas convencionales de bioensayo, para determinar sus constantes de enlazamiento. Aquellos ligados con afinidades de enlazamiento suficientemente altas (con valores de IC₅₀ típicamente por debajo de 100 nM y por encima de 1 fM), se consideran compuestos exitosos y son candidatos para convertirse en sondas para la formación de imágenes moleculares. Sin embargo, si la selección inicial no revela compuestos con suficiente afinidad de enlazamiento, se inicia una nueva selección y se repite en forma iterativa el proceso hasta identificar un candidato óptimo como sonda para formación de imágenes. Se convierten luego los compuestos exitosos en una sonda para formación de imágenes moleculares a través de técnicas radioquímicas estándar.

Breve descripción de los dibujos

Habiendo descrito la invención en términos generales, se hará referencia ahora a los dibujos acompañantes, que no está necesariamente dibujados a escala, y en donde:

La Fig. 1 es una representación esquemática de un proceso de química clic *in situ*;

La Fig. 2 es una representación esquemática de una modalidad de un método de química clic *in situ* de la invención para seleccionar ligandos utilizando una plantilla de quinasa;

La Fig. 3a ilustra dos rutas a lo largo de las cuales se pueden formar ligandos dentro de Akt; y

La Fig. 3b es una estructura cristalina de rayos X de Akt que revela una corta estancia entre la unidad estructural de ribosa y el residuo de arginina (ruta A) y una corta distancia entre el grupo fosfato de la ATP y el residuo de serina (ruta B).

Descripción detallada de las modalidades preferidas

Se describirá ahora la presente invención en forma más completa. Esta invención puede, sin embargo, ser expresada en muchas formas diferentes y no debe considerarse como limitada a las modalidades expuestas aquí; en vez de eso, se proveen estas modalidades para que la divulgación sea total y completa y transmita plenamente del alcance de la invención a aquellos capacitados en el arte.

I. Definiciones

Como se las utiliza aquí, las formas singulares "un", "una", "el", "la", incluyen las referencias en plural a menos que el contexto disponga claramente otra cosa.

"Alquilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada, típicamente aproximadamente en el rango de 1 a 20 átomos de longitud. Tales cadenas hidrocarbonadas pueden ser una cadena recta o ramificada, aunque típicamente se prefiere una cadena recta. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen etilo, propilo, butilo, pentilo, 1-metilbutilo, 1-etilpropilo, 3-metilpentilo, y similares. Como se lo utiliza aquí, "alquilo" incluye cicloalquilo cuando están referenciados tres o más átomos de carbono.

"Sitio de anclaje" como se utiliza aquí es sinónimo con el primer sitio de enlazamiento.

"Arilo" significa uno o más anillos aromáticos, cada uno de cinco o seis átomos de carbono en el núcleo. Arilo incluye múltiples anillos arilo que pueden estar fusionados, como el naftilo o no fusionados, como el bifenilo. Los anillos arilo pueden estar también fusionados o no fusionados con uno o más anillos cíclicos hidrocarbonados, heteroarilo, o heterocíclicos. Como se utiliza aquí, "arilo" incluye heteroarilo.

Un "objetivo biológico" puede ser cualquier molécula biológica involucrada en rutas biológicas asociadas con cualquiera de las diferentes enfermedades y condiciones, incluyendo cáncer (por ejemplo, leucemia, linfomas, tumores cerebrales, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer gástrico, así como cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer óseo, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer esofágico, cáncer de ojo, cáncer de vesícula, cáncer de hígado, cáncer del riñón, cáncer de laringe, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer pancreático,

cáncer de pene, tumores glandulares, cáncer rectal, cáncer de intestino delgado, sarcoma, cáncer testicular, cáncer uretral, cáncer uterino, y cáncer vaginal), diabetes, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades respiratorias, enfermedades del sistema digestivo, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, y similares. Los ejemplos de rutas biológicas incluyen, por ejemplo, regulación del ciclo celular (por ejemplo, proliferación celular y apoptosis), angiogénesis, rutas de señalización, rutas supresoras de tumores, inflamación (COX-2), oncogenes, y receptores del factor de crecimiento. El objetivo biológico puede ser denominado también como la "biomacromolécula objetivo" o la "biomacromolécula". El objetivo biológico puede ser un receptor, tal como receptores enzimáticos, canales iónicos que dependen del ligando, receptores acoplados a proteína G, y factores de transcripción. El objetivo biológico es preferiblemente una proteína o un complejo proteico, tal como enzimas, proteínas transportadoras de membrana, hormonas, y anticuerpos. En una modalidad particularmente preferida, la proteína biológica objetivo es una enzima, tal como anhidrasa carbónica II y sus enzimas relacionadas tales como la anhidrasa carbónica IX y la XII.

Los "grupos funcionales complementarios" como se utiliza aquí, significan grupos químicamente reactivos que reaccionan entre sí con alta especificidad (es decir, los grupos son selectivos entre sí y su reacción proporciona productos bien definidos en una forma predecible) para formar nuevos enlaces covalentes.

"Cicloalquilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada cíclica saturada o no saturada, que incluye compuestos cíclicos que forman puentes, fusionados o espiro, preferiblemente elaborados con 3 hasta aproximadamente 12 átomos de carbono, más preferiblemente de 3 hasta aproximadamente 8.

"Heteroarilo" es un grupo arilo que contiene de uno a cuatro heteroátomos, preferiblemente N, O, o S, o una combinación de los mismos. Los anillos heteroarilo pueden estar fusionados también con uno o más anillos hidrocarbonados cíclicos, heterocíclicos, arilo, o heteroarilo.

"Heterociclo" o "heterocíclico" significa uno o más anillos de 5 - 12 átomos, preferiblemente 5 - 7 átomos, con o sin insaturación o carácter aromático y que tienen al menos un átomo en el anillo que no es un carbono. Los heteroátomos preferidos incluyen azufre, oxígeno, y nitrógeno.

Una "quinasa" como se utiliza aquí y también definida como se conoce en el arte, es una enzima que transfiere un fosfato desde la adenosina trifosfato (ATP) sobre una molécula de sustrato. Una quinasa incluye un sitio de enlazamiento para ATP, que es un cofactor en la fosforilación, y al menos un sitio de enlazamiento para la molécula de sustrato, que es típicamente otra proteína.

"Grupo saliente", como se utiliza aquí se refiere a grupos que son fácilmente desplazados, por ejemplo, por un nucleófilo, tal como una amina, un tiol o un alcohol nucleófilo o su sal. Tales grupos salientes son bien conocidos e incluyen, por ejemplo carboxilatos, N-hidroxisuccinimida, N-hidroxibenzotriazol, haluros, triflatos, tosilatos, -OR y -SR y similares.

Un "ligando" es una molécula, que tiene preferiblemente un peso molecular aproximadamente menor a 800 Da., más preferiblemente aproximadamente menor a 600 Da., que contiene un primer grupo que exhibe afinidad por un primer sitio de enlazamiento sobre una molécula biológica objetivo, tal como una proteína, y un segundo grupo que exhibe afinidad por un segundo sitio de enlazamiento sobre la misma molécula biológica objetivo. Los dos sitios de enlazamiento pueden ser áreas separadas dentro del mismo bolsillo de enlazamiento sobre la molécula objetivo. Los ligandos exhiben preferiblemente afinidad de enlazamiento nanomolar por la molécula biológica objetivo. En ciertos aspectos como se divulga aquí, se utiliza ligando como sinónimo de un "sustrato". Un ligando puede contener una "estructura molecular" como se define aquí.

Un "enlazador" como se utiliza aquí se refiere a una cadena que contiene de 1 a 10 átomos y pueden incluir los átomos o los grupos, tales como C, -NR-, O, S, -S(O)-, -S(O)₂-, CO, -C(NR)- y similares, y en donde R es H o se selecciona de entre el grupo que consiste de alquilo(C₁₋₁₀), cicloalquilo(C₃₋₈), Arilalquilo(C₁₋₅), amino, arilo, heteroarilo, hidroxilo, alcoxi(C₁₋₁₀), ariloxi, heteroariloxi, cada uno sustituido o no sustituido. La cadena enlazadora puede incluir también parte de un anillo saturado, insaturado o aromático, incluidos anillos policíclicos y heteroaromáticos.

Un "grupo de quelación mecánica" como se utiliza aquí, es como está definido en el arte, y puede incluir, por ejemplo, una molécula, un fragmento o un grupo funcional que se une selectivamente o enlaza iones metálicos, y forma un complejo. Ciertos compuestos orgánicos pueden formar enlaces coordinados con metales a través de dos o más átomos del compuesto orgánico. Los ejemplos de tales moléculas incluyen DOTA, EDTA, y porfina.

"Estructura molecular" se refiere a una molécula o a una porción o fragmento de una molécula que está unida al grupo funcional clic, opcionalmente unida a un grupo saliente y/o isótopo radioactivo o, en ciertas variaciones, la molécula puede estar unida a un enlazador que está unido al grupo funcional clic. Los ejemplos no exclusivos de tales estructuras moleculares incluyen, por ejemplo, un metileno sustituido o no sustituido, grupos alquilo (C₁ - C₁₀) que son lineales o ramificados, incluyendo opcionalmente cada uno un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste de O, N y S, grupos arilo y heteroarilo cada uno sustituido o no sustituido, biomacromoléculas, nucleósidos y sus análogos o derivados, péptidos e imitaciones de péptidos, carbohidratos y combinaciones de los mismos.

"Grupo de quelación metálico polidentado" significa un grupo químico con dos o más átomos donadores que pueden coordinar a un metal simultáneamente (es decir, quelato). Por lo tanto, un grupo polidentado tienen dos o más átomos donadores y ocupa dos o más sitios en una esfera de coordinación.

5 Los términos "paciente" e "individuo" se refieren a cualquier individuo humano o animal, incluyendo particularmente a todos los mamíferos.

El término "reacción pericíclica" se refiere a una reacción en la cual se crean o se rompen enlaces en un estado de transición cíclico concertado. Una reacción concertada es una que no involucra intermediarios durante el transcurso de la reacción. Típicamente, existe un efecto solvente relativamente pequeño sobre la tasa de reacción, a menos que los reactivos en sí mismos estén cargados, es decir carbonio o carbaniones.

10 Como se utiliza aquí, compuesto "radioquímico" pretende abarcar cualquier compuesto orgánico, inorgánico u organometálico que contiene un isótopo radioactivo unido en forma covalente, cualquier solución iónica radioactiva inorgánica (por ejemplo, solución iónica de Na^{18}F), o cualquier gas radioactivo (por ejemplo, ^{11}C] CO_2), incluyendo particularmente sondas radioactivas para formación de imágenes moleculares para administración a un paciente (por ejemplo, por medio de inhalación, ingestión, o de inyección intravenosa) para el propósito de formar imágenes del tejido, también son denominados en el arte como compuestos radiofarmacéuticos, radiotrazadores, o radioligandos. Aunque la presente invención está principalmente dirigida a la síntesis de sondas para la formación de imágenes moleculares por emisión de positrones para abuso en sistemas de formación de imágenes por PET, la invención podría ser fácilmente adaptada para la síntesis de cualquier compuesto radioactivo que contenga un radionúclido, incluidos radioquímicos útiles en otros sistemas de formación de imágenes, tales como tomografía computarizada de emisión de fotones individuales (SPECT).

25 Como se utiliza aquí, el término "isótopo radioactivo" se refiere a isótopos que exhiben decaimiento radiactivo (es decir, emisión de positrones) y agentes de radiomarcación que contienen un isótopo radioactivo (por ejemplo, ^{11}C] metano , ^{11}C] $\text{monóxido de carbono}$, ^{11}C] $\text{dióxido de carbono}$, ^{11}C] fosgeno , ^{11}C] jurea , ^{11}C] $\text{bromuro de cianógeno}$, así como diferentes cloruros ácidos, ácidos carboxílicos, alcoholes, aldehídos, y cetonas que contienen carbono 11). Tales isótopos son también llamados en el arte como radioisótopos o radionúclidos. Los isótopos radioactivos son llamados aquí utilizando diferentes combinaciones comúnmente utilizadas del nombre o del símbolo del elemento y su número de masa (por ejemplo, ^{18}F , F-18, o flúor 18). Los ejemplos de isótopos radioactivos incluyen I-124, fluoruro F-18, C-11, N-13, y O-15, que tienen una vida media de 4,2 días, 110 minutos, 20 minutos, 10 minutos, y 2 minutos, respectivamente. Se disuelve preferiblemente el isótopo radioactivo en un solvente orgánico, tal como un solvente aprótico polar. El isótopo radioactivo utilizado en el presente método es F-18.

30 Un agente para formación de imágenes ópticas se refiere a moléculas que tienen una emisión de longitud de onda mayor a 400 nm y por debajo de 1200 nm. Los ejemplos de agentes de formación de imágenes ópticas son Alex, Flúor, BODIPY, Azul Nilo, COB, rodamina, verde Oregón, fluoresceína y acridina.

35 El término "precursor reactivo" está dirigido a cualquiera entre una variedad de moléculas que pueden ser modificadas químicamente por medio de la adición de una azida o un grupo alquínico, tal como moléculas pequeñas, productos naturales, o biomoléculas (por ejemplo, péptidos o proteínas). Para la formación de un ligando a partir de dos moléculas precursoras, una de las moléculas precursoras incluye un isótopo no radioactivo de un elemento que tiene un radioisótopo dentro de su núcleo. En ciertos aspectos como se utiliza aquí, el término "ligando" puede referirse al precursor, a los compuestos y sondas para formación de imágenes que se enlazan con la biomacromolécula. Los dos precursores del ligando exhiben preferiblemente afinidad con sitios de enlazamiento separados (o secciones separadas del mismo sitio de enlazamiento o bolsillo) sobre una molécula biológica objetivo, tal como un enzima. El precursor reactivo que tiene afinidad de enlazamiento por un sitio activo sobre la biomacromolécula es algunas veces denominado aquí como la "molécula de anclaje". El precursor reactivo que tiene afinidad de enlazamiento por el sitio de enlazamiento del sustrato de una quinasa es algunas veces denominado aquí como en la "imitación del sustrato". El término "precursor reactivo" puede referirse también al precursor o al compuesto que son utilizados para preparar los compuestos candidatos que incluyen la biblioteca de compuestos candidatos.

50 En un aspecto particular del método con la modalidad radioquímica del ligando, una de las moléculas precursoras pueden incluir también un grupo saliente que puede ser fácilmente desplazado por medio de sustitución nucleofílica con el propósito de unir en forma covalente un radioisótopo con el precursor. Los ejemplos de precursores reactivos incluyen moléculas pequeñas que tienen similitudes estructurales con las moléculas existentes de la sonda de PET, EGF, marcadores de cáncer (por ejemplo, p185HER2 para cáncer de mama, CEA para ovario, cáncer de pulmón, mama, páncreas, y tracto gastrointestinal, y PSCA para cáncer de próstata), receptores del factor de crecimiento (por ejemplo, EGFR y VEGFR), glicoproteínas relacionadas con enfermedades autoinmunes (por ejemplo, HC gp-39), receptores de glicoproteína específicos de inflamación o de tumor (por ejemplo, selectinas), anticuerpo específico de integrina, antígenos relacionados con virus (por ejemplo, glicoproteína D de HSV, EV gp), y productos génicos específicos del órgano.

"Sustituido" o un "sustituyente" como se utiliza aquí, significan que un compuesto o grupo funcional incluye uno o más átomos de hidrógeno que están sustituidos por un grupo (un sustituyente) tal como -alquilo C_{1-5} , alquénilo C_{2-5} ,

halógeno (átomo de cloro, flúor, bromo, yodo), -CF₃, nitro, oxo, -OH, carboxilo, -COO alquilo C₁₋₅, -O alquilo C₁₋₅, -CONH alquilo C₁₋₅, -NHCO alquilo C₁₋₅, -OSO alquilo C₁₋₅, -SOO alquilo C₁₋₅, -SOONH alquilo C₁₋₅, -NHSO₂ alquilo C₁₋₅, arilo, heteroarilo y similares, cada uno de los cuales puede estar sustituido adicionalmente.

5 "Imitaciones de sustrato" como se utiliza aquí significa compuestos que imitan sustratos de enzima en sus estructuras tridimensionales, distribución de carga y en la orientación del donante o aceptor del enlace de hidrógeno, de tal manera que pueden ser reconocidos por el sitio activo de la enzima.

II. Método de química clic *in situ*

10 El método tradicional para la preparación de sondas para la formación de imágenes moleculares comienza con la identificación de una molécula de enlazamiento firme. Esta molécula puede haber sido identificada previamente a partir de una selección grande o por medio del desarrollo de SAR. Se evalúa luego el compuesto en términos de la probabilidad de radiomarcación así como por los sitios de marcación preferenciales sobre la misma molécula. Una vez se determina la posición para la radiomarcación, se convierte el compuesto en un agente para formación de imágenes por medio de marcación con fluoruro-¹⁸F si se utiliza para formación de imágenes por PET, inyectado en un organismo vivo apropiado tal como un ratón y luego se forman imágenes con un escáner PET para determinar la biodistribución del trazador, los perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos, rutas de metabolismo y de excreción. En los casos en donde el elemento radioactivo introducido en la molécula no estaba presente en la molécula original como su isótopo no radioactivo, existe la posibilidad de que el compuesto marcado se comportará en forma muy diferente a la del compuesto original. Por ejemplo, la introducción de fluoruro-¹⁸F en lugar de un átomo de hidrógeno puede provocar un debilitamiento de la afinidad de enlazamiento de la sonda para formación de imágenes hacia el objetivo. Este debilitamiento puede evitar que el trazador se ubique *in vivo* evitando así la formación de una imagen adecuada por PET.

20 Un enfoque alternativo para la identificación de sondas para formación de imágenes moleculares sería la preparación de una biblioteca de ligandos que no contienen radioisótopos y seleccionar cada ligando individual por la actividad potencial *in vitro*. Una vez se encuentra un acierto, esta molécula es convertida en su análogo radioactivo y se forma una imagen *in vivo*. Este análogo radioactivo del compuesto original se espera que posea las mismas características fisicoquímicas que el compuesto original debido a la similitud estérica y electrónica del radioisótopo. El inconveniente de este método es que se debe preparar, identificar, purificar y seleccionar en forma individual un número potencialmente grande de compuestos por la actividad. Este proceso requiere de mucho tiempo, inversión de capital y esfuerzo. Un tercer método, que utiliza el objetivo biológico como el recipiente de reacción para montar su sonda preferida para formación de imágenes moleculares potenciales a través del uso de química clic, exhibía diferentes ventajas sobre los dos métodos anteriores.

30 La química clic proporciona la oportunidad para diseñar trazadores de molécula pequeña para formación de imágenes por PET, lo que muestra afinidades extremadamente altas por sus objetivos biológicos, preparando el escenario para formación de imágenes moleculares de "alto desempeño" con excelentes relaciones de señal con respecto al fondo. La química clic que es un enfoque modular para síntesis química que utiliza únicamente las transformaciones químicas más prácticas y confiables. Esta técnica produce inhibidores de alta afinidad mediante el ensamblaje de reactivos como bloques de construcción en forma irreversible dentro de bolsillos para el enlazamiento del objetivo. El enfoque general de la química clic *in situ* se presenta en la Figura 1. Las técnicas de química clic están escritas, por ejemplo, en las siguientes referencias, que se incorporan aquí como referencia en su totalidad:

- 40
- Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angewandte Chemie, International Edition* 2001, 40, 2004 - 2021.
 - Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. *Drug Discovery Today* 2003, 8, 1128 - 1137.
 - Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angewandte Chemie, International Edition* 2002, 41, 2596 - 2599.
 - Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *Journal of Organic Chemistry* 2002, 67, 3057 - 3064.
- 45
- Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. *Journal of the American Chemical Society* 2003, 125, 3192 - 3193.
 - Lee, L. V.; Mitchell, M. L.; Huang, S.-J.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Wong, C.-H. *Journal of the American Chemical Society* 2003, 125, 9588 - 9589.
- 50
- Lewis, W. G.; Green, L. G.; Grynszpan, F.; Radic, Z.; Carlier, P. R.; Taylor, P.; Finn, M. G.; Barry, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2002, 41, 1053 - 1057.
 - Manetsch, R.; Krasinski, A.; Radic, Z.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C. *Journal of the American Chemical Society* 2004, 126, 12809 - 12818.
 - Mocharla, V. P.; Colasson, B.; Lee, L. V.; Roeper, S.; Sharpless, K. B.; Wong, C.-H.; Kolb, H. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 116 - 120.

• M. Whiting, J. Muldoon, Y.-C. Lin, S. M. Silverman, W. Lindstrom, A. J. Olson, H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, J. H. Elder, V. V. Fokin, *Angew. Chem.* 2006, 118, 1463 - 1467; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2006, 45, 1435 - 1439.

5 Aunque pueden ser utilizados otros grupos funcionales para química clic, tal como aquellos descritos en las referencias anteriores, se prefiere el uso de reacciones de cicloadición, particularmente la reacción de azidas con grupos alquínico. Alquínos, tales como alquínos terminales y azidas experimentan cicloadición 1,3-dipolar formando 1,2,3-triazoles 1,4-disustituídos. Alternativamente, se pueden formar un 1,2,3-triazol 1,5-disustituído utilizando reactivos azida y alquínico (Krasinski, A., Fokin, V. V. & Barry, K. *Organic Letters* 2004, 1237 - 1240). También se pueden utilizar reacciones Hetero-Diels-Alder o reacciones de cicloadición 1,3-dipolares (ver Huisgen 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry (Vol. 1) (Padwa, A., ed.), páginas 1 - 176, Wiley; Jorgensen *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2000, 39, 3558 - 3588; Tietze, L. F. y Ketschau, G. *Top. Curr. Chem.* 1997, 189, 1 - 120). Estas reacciones son catalizadas por la molécula biológica objetivo *in situ* dentro de sus bolsillos de enlazamiento. En contraste con la reacciones biológicas objetivo catalizadas, la reacción térmica de cicloadición 1,3-dipolar entre azida y acetileno o precursores reactivos de alquínico, que portan grupos de enlazamiento para cualquiera de los sitios, es extremadamente lenta a temperatura ambiente, y los reactivos son bioortogonales (es decir, que no reaccionan con moléculas biológicas y son en gran parte inertes bajo condiciones fisiológicas) soportando así la reivindicación de que los compuestos inhibidores son generados *in situ*. Esta minimización de la reacción no catalizada evita la formación no deseada y la identificación de ligandos objetivo no moldeados lo que conduce a falsos positivos en el método de selección.

20 En una modalidad particular, el método de química clic *in situ* como el discutido aquí genera nuevos ligandos con potencias subnanomolares que portan la etiqueta para PET como parte del diseño. Durante la fase de descubrimiento del ligando, se utiliza un isótopo 'frío' o no radioactivo (por ejemplo, F-19) como un marcador de posición para el radionúclido de PET. Una vez se encuentra el ligando de alta afinidad, se reemplaza F-19 por F-18. En esta estrategia guiada al objetivo utiliza la enzima en sí misma como molde para generar potentes inhibidores del ligando a partir de reactivos que sirven como bloques de construcción 'monovalentes' que se enlazan selectivamente con la enzima y luego se enlazan en forma irreversible entre sí dentro de los confines de sus bolsillos de enlazamiento. Ya que este enfoque emplea el objetivo biológico para ensamblar sus propios inhibidores a partir de pocos reactivos (que pueden ser combinados en miles de formas diferentes), en vez de requerir de la síntesis, purificación, y selección de miles de compuestos de bibliotecas, promete ser más eficiente que la química tradicional de combinación. Las pruebas de seguimiento de los éxitos generados por la enzima establecen entonces su afinidad de enlazamiento con y la especificidad por el objetivo. En una modalidad particular, las moléculas bivalentes que tienen múltiples interacciones con la biomacromolécula, tales como una proteína, los éxitos resultantes son muy potentes. Las moléculas bivalentes resultantes se enlazan con el sitio de enlazamiento del cofactor y llegan al bolsillo del sustrato. Principalmente por razones de entropía (se evita la pérdida de tres grados de libertad rotacional y traslacional), los inhibidores del ligando muestran una afinidad mucho mayor por sus objetivos biológicos que los componentes individuales. De este modo, incluso los fragmentos con únicamente afinidad micromolar modesta con los bolsillos individuales de enlazamiento pueden generar inhibidores nanomolares cuando se acoplan juntos para permitir interacciones óptimas de enlazamiento con el objetivo biológico. De este modo, la afinidad de enlazamiento del reactivo que sirve como bloque de construcción o el precursor con la enzima no requieren estar en el rango nanomolar. La afinidad micromolar es suficiente para que ocurra la reacción de la química clic.

45 La química clic *in situ* ofrece un nuevo enfoque atractivo para descubrir una sonda molecular, ya que no depende de la selección de los compuestos finales, preparados en forma laboriosa a través de medios tradicionales, sino que en vez de eso permite que la enzima seleccione y combine bloques de construcción que encajan dentro de su sitio de enlazamiento para ensamblar sus propias moléculas inhibidoras. Por ejemplo, sólo con 200 bloques de construcción (100 monoazidas y 100 monoacetilenos), se puede escanear rápidamente a través de 20.000 combinaciones posibles (100 x 100 x 2; el factor '2' da cuenta de la posible formación de *syn* o *anti*-triazol) sin tener que elaborar realmente estos compuestos. Este número incluso se hace mayor, con el mismo número de bloques de construcción, si se incluyen di o triazidas o di o triacetilenos, proporcionándole así a la enzima una mayor flexibilidad para escoger el bloque de construcción apropiado y el grupo funcional al mismo tiempo. El método de selección es tan simple como determinar si se ha formado el producto o no en una mezcla dada de prueba por medio de LC/MS. Un compuesto que es formado por la enzima es probable que sea un buen aglomerante y selectivo, debido a la naturaleza multivalente de la interacción.

55 El desarrollo del ligando o del método para identificar sondas para formación de imágenes puede presentarse en dos etapas. En ciertas modalidades, durante la fase de descubrimiento, cada compuesto por otra un átomo F-19 'frío', para preparar la introducción posterior de F-18 'caliente' sin cambiar la afinidad de enlazamiento del compuesto apreciablemente con la enzima. Los precursores son compuestos que se adhieren al bolsillo de enlazamiento del objetivo con baja afinidad micromolar o mejor afinidad, y que portan un grupo funcional bio-ortogonal (azida o acetileno). En una modalidad del método, cada molécula porta un átomo de flúor, que posteriormente será reemplazado por el radionúclido F-18. En ciertas modalidades, es preferible introducir el átomo de flúor en la molécula de anclaje, en vez de la imitación del sustrato o del módulo enlazador, ya que esto minimizará el esfuerzo

de síntesis - se necesitará elaborar compuestos que contienen menor cantidad de flúor, ya que el número total de moléculas potenciales de anclaje es mucho menor que aquel de las unidades estructurales de sustrato/enlazador.

5 En una modalidad, el método de selección involucra la identificación de una pluralidad de moléculas que exhiben afinidad por el sitio de enlazamiento de la enzima objetivo y unir en forma covalente un isótopo no radioactivo de un elemento que incluye al menos un isótopo radioactivo en su núcleo (por ejemplo, F-19) a la molécula. Un grupo funcional capaz de participar en una reacción de química clic, tal como un grupo azida o alquínico, es también unido a la molécula, opcionalmente a través de un enlazador. Los miembros individuales de la pluralidad resultante de moléculas son luego mezclados con la molécula objetivo y con miembros individuales de una pluralidad o biblioteca de compuestos que pueden exhibir afinidad por un sitio de enlazamiento del sustrato de la enzima. Los miembros de la biblioteca de enlazamiento del sustrato han sido modificados químicamente para incluir un grupo funcional de química clic compatible con el grupo funcional de la biblioteca de moléculas de enlazamiento del cofactor. De este modo, cualquier par de compuestos, uno de cada biblioteca, que exhiba afinidad por los sitios de enlazamiento de la enzima se enlazarán en forma covalente a través de los grupos funcionales de la química clic *in situ*. El proceso de selección puede utilizar un equipo de selección convencional conocido en el arte tal como placas de microtitulación de múltiples pozos.

10 Se puede utilizar un espectrómetro de masas para el análisis secuencial de los datos en forma automatizada del proceso de selección. Los ejemplos de equipos espectrofotómetros que pueden ser utilizados incluyen al sistema MSD 100 SL de Agilent, sistemas lineales de trampa de iones (ThermoFinnigan LTQ), trampas de iones cuadrupolo (LCQ), o un cuadrupolo de tiempo de vuelo (QTOF de Waters o de Applied Biosystems). Cada uno de estos analizadores tiene interfases de HPLC muy efectivas para experimentos de LC-MS.

20 En una modalidad, el fragmento precursor de inicio, que puede ser una molécula de anclaje, puede llevar a cabo el descubrimiento por medio del diseño de bibliotecas pequeñas de compuestos objetivo (por ejemplo, menos de 100 compuestos) con base en fármacos y/o sustratos conocidos. Estas bibliotecas pueden ser seleccionadas utilizando ensayos tradicionales de enlazamiento. Las moléculas de anclaje pueden ser incubadas con la enzima objetivo y bibliotecas pequeñas de reactivos complementarios de química clic o precursores (por ejemplo, acetilenos, si la molécula de anclaje es una azida). Cada mezcla de reacción puede ser analizada por medio de LC/MS para identificar productos que se forman por medio de la enzima. Una validación exitosa se lleva a cabo a través de experimentos de competición para demostrar que el compuesto es realmente formado por la enzima, y los ensayos de enlazamiento pueden establecer las actividades de enlazamiento de los éxitos generados por la enzima.

25 En una modalidad, las moléculas de anclaje portan grupos funcionales bio-ortogonales (por ejemplo, $-N_3$, $-C\equiv CR$, donde R = H, alquilo, arilo, etc.) para su posterior conversión en compuestos ligando dentro de la enzima. Preferiblemente, R es un hidrógeno. Además, cada molécula candidata de anclaje porta un átomo de flúor, que es fácilmente introducida por medio de química de sustitución nucleofílica, para permitir la marcación posterior con $[F-18]$ por medio del reemplazo de $[F-19]$ 'frío' con el correspondiente radionúclido. Se espera que este cambio tenga un efecto mínimo sobre la afinidad de enlazamiento, haciendo por lo tanto más predecible el desarrollo de la sonda para PET.

30 La naturaleza y la longitud del enlazador entre los dos grupos de reacción o precursores se pueden seleccionar para producir compuestos con afinidades óptimas de enlazamiento. Por lo tanto, se pueden unir diferentes tipos de enlazadores a las imitaciones de sustrato discutidas anteriormente. Esto se puede lograr fácilmente a través de reacciones de formación de enlaces carbono - heteroátomo, que involucran a los grupos azida ya sea directamente (formación de triazol) o indirectamente (reducción de azida, seguido por acilación o sulfonilación de las aminas resultantes). La biblioteca de imitaciones de sustrato incluye preferiblemente di-azidas y di-acetilenos para incrementar el número de las posibles reacciones de combinación.

Aspectos de la invención:

45 Los aspectos y modalidades de la invención se exponen en las reivindicaciones acompañantes.

En una modalidad, se provee un método para identificar una sonda candidata para formación de imágenes, comprendiendo el método:

50 a) poner en contacto una primera biblioteca de compuestos candidatos con una biomacromolécula objetivo, cada compuesto de la primera biblioteca de compuestos incluye un primer grupo funcional capaz de participar en una reacción de química clic, y cada compuesto exhibiendo opcionalmente afinidad por un primer sitio de enlazamiento de la biomacromolécula objetivo que incluye un primer sitio de enlazamiento y un segundo sitio de enlazamiento;

b) la identificación de un primer miembro de la primera biblioteca de compuestos candidatos que exhiben afinidad por el primer sitio de enlazamiento;

55 c) poner en contacto al primer miembro identificado a partir de la primera biblioteca de compuestos candidatos que exhiben afinidad por el primer sitio de enlazamiento con la biomacromolécula objetivo;

- 5 d) poner en contacto una segunda biblioteca de compuestos candidatos con el primer miembro y la biomacromolécula objetivo, la segunda biblioteca de compuestos candidatos exhibiendo opcionalmente afinidad por el segundo sitio que enlazamiento, en donde cada compuesto de la segunda biblioteca de compuestos candidatos incluye un segundo grupo funcional complementario capaz de participar en una reacción de química clic con el primer grupo funcional, en donde o bien cada compuesto de la primera biblioteca o cada compuesto de la segunda biblioteca, o cada compuesto tanto de la primera como de la segunda biblioteca de compuestos, incluye independientemente un isótopo no radioactivo de un elemento químico y en donde el elemento químico incluye al menos un radioisótopo, opcionalmente unido a través de un enlazador, en donde el isótopo no radioactivo es F-19, y en donde el isótopo radioactivo es F-18;
- 10 e) la reacción del segundo grupo funcional complementario con el primer grupo funcional a través de una reacción de química clic inducida por una biomacromolécula para formar la sonda candidata para formación de imágenes;
- f) el aislamiento e identificación de la sonda candidata para formación de imágenes;
- g) la preparación de la sonda candidata para formación de imágenes por medio de síntesis química; y
- 15 h) la conversión de la sonda candidata para formación de imágenes en una sonda para formación de imágenes por medio de la conversión del isótopo no radioactivo del elemento en el isótopo radioactivo F-18. En una variación del método, se selecciona la biomacromolécula de entre el grupo que consiste de enzimas, receptores, ADN, ARN, canales de iones y anticuerpos. En otra variación, la biomacromolécula objetivo es una proteína que es sobreexpresada en estados de enfermedad, tales como beta-amiloide en tejido cerebral de pacientes con enfermedad de Alzheimer.
- 20 En otro aspecto del método anterior, el segundo sitio de enlazamiento constituye una porción del primer sitio de enlazamiento. En una variación del método, cada compuesto de la primera biblioteca o cada compuesto de la segunda biblioteca, o cada compuesto tanto de la primera como de la segunda biblioteca de compuestos incluye un grupo metálico de quelación, y/o un fluoróforo. En una variación particular, la reacción de la química clic es una reacción pericíclica. En otra variación de la anterior, la reacción pericíclica es una reacción de cicloadición. En aún otra variación, la reacción de cicloadición se selecciona de entre el grupo que consiste de una reacción de Diels-Alder o una reacción de cicloadición 1,3-dipolar. Preferiblemente, en ciertos métodos utilizados aquí, la reacción de cicloadición es una reacción de cicloadición 1,3-dipolar.
- 25 En aún otro aspecto del método anterior, los grupos funcionales clic complementarios incluyen una azida y un alquino y la reacción clic forma un producto que contiene 1,2,3-triazol. En una variación, el primer grupo funcional es una azida y el segundo grupo funcional es un alquino, o en donde el primer grupo funcional es un alquino y el segundo grupo funcional es una azida. En otra variación, el alquino es un alquino terminal. En una variación particular del método anterior, las etapas de a) hasta f) se llevan a cabo en un procedimiento iterativo de preparación de una nueva primera biblioteca de compuestos y/o una segunda biblioteca de compuestos y se selecciona nuevamente hasta que se identifica una sonda candidata para formación de imágenes con enlazamiento optimizado, biodistribución, metabolismo y propiedades farmacocinéticas.
- 30 En un aspecto particular, la sonda identificada para formación de imágenes exhibe alta afinidad y especificidad de enlazamiento por la biomacromolécula objetivo. Preferiblemente, la afinidad de enlazamiento es de nanomolar o mejor, y la sonda identificada para formación de imágenes exhibe propiedades óptimas de biodistribución, metabolismo, farmacocinética y eliminación.
- 35 En una variación del método anterior, el grupo saliente puede ser convertido para formar un derivado marcado por medio de una reacción de intercambio, una reacción de sustitución nucleofílica o por medio de una reacción de sustitución electrofílica. En otra variación del método anterior, la sonda candidata identificada para formación de imágenes está marcada con un isótopo radioactivo, y la sonda resultante radioactiva para formación de imágenes se utiliza para un método de formación de imágenes seleccionado de entre el grupo que consiste de PET, SPECT y formación de imágenes ópticas.
- 40 En un aspecto particular, la sonda identificada para formación de imágenes exhibe alta afinidad y especificidad de enlazamiento por la biomacromolécula objetivo. Preferiblemente, la afinidad de enlazamiento es de nanomolar o mejor, y la sonda identificada para formación de imágenes exhibe propiedades óptimas de biodistribución, metabolismo, farmacocinética y eliminación.
- 45 En un aspecto del método, para cierta biomacromolécula, el primer sitio de enlazamiento es un sitio de enlazamiento de un cofactor, y el segundo sitio de enlazamiento es un sitio de enlazamiento de sustrato.
- En una variación de los métodos anteriores, la enzima objetivo se selecciona de entre el grupo que consiste de una enzima sobreexpresada o sobreactivada en estados de enfermedad tales como COX-2, AKT, P13K, o CA-9/CA-12.
- 50 En otra variación, la biomacromolécula objetivo es una proteína que es sobreexpresada en estados de enfermedad, incluyendo beta-amiloide en tejido cerebral de pacientes con enfermedad de Alzheimer. En aún otra variación, el segundo sitio de enlazamiento constituye una porción del primer sitio de enlazamiento. En un aspecto particular del método anterior, el segundo sitio de enlazamiento constituye una porción o una sección del primer sitio de enlazamiento y el enlazamiento del segundo compuesto candidato se une al sitio de enlazamiento por recubrimiento del primer sitio que enlazamiento. En aún otra variación de los métodos anteriores, cada compuesto de la primera biblioteca o cada compuesto de la segunda biblioteca, o cada compuesto tanto de la primera como de la segunda bibliotecas de compuestos incluye un grupo metálico de quelación, y/o un fluoróforo. En otra variación, la reacción
- 55

de la química clic es una reacción pericíclica. Preferiblemente, en ciertas variaciones, la reacción pericíclica es una reacción de cicloadición. En aún otra variación, la reacción de cicloadición se selecciona de interés grupo que consiste de una reacción de Diels-Alder o una reacción de cicloadición 1,3-dipolar. Preferiblemente, en ciertas variaciones de la anterior, la reacción de cicloadición es una reacción de cicloadición 1,3-dipolar. En aún otra variación, los grupos funcionales complementarios clic incluyen una azida y un alquino y la reacción clic forma un producto que contiene 1,2,3-triazol.

En una variación particular del método anterior, el primer grupo funcional es una azida y el segundo grupo funcional es un alquino terminal, o en donde el primer grupo funcional es un alquino terminal y el segundo grupo funcional es una azida. En otra variación del método, se llevan a cabo las etapas de a) hasta f) en un procedimiento iterativo de preparación de una nueva primera biblioteca de compuestos y/o una segunda biblioteca de compuestos y se hace una nueva selección hasta identificar una sonda candidata para formación de imágenes que tienen una afinidad de enlazamiento optimizada. En aún otra variación, el grupo saliente es sensible a la formación de un derivado marcado por medio de una reacción de intercambio, una reacción de sustitución nucleofílica o por medio de una reacción de sustitución electrofílica. En un aspecto del método anterior, la sonda candidata identificada para formación de imágenes es marcada con un isótopo radioactivo, y se utiliza la sonda radioactiva resultante para formación de imágenes para un método de formación de imágenes seleccionado de entre el grupo que consiste de PET, SPECT y formación de imágenes ópticas. En una variación de lo anterior, los grupos funcionales complementarios clic incluyen una azida y un alquino y la reacción clic forma un producto que contiene 1,2,3-triazol. En aún otra variación, el primer grupo funcional es una azida y el segundo grupo funcional es un alquino, o donde el primer grupo funcional es un alquino y el segundo grupo funcional es una azida. En un aspecto particular de lo anterior, el alquino empleado en la reacción clic es un alquino terminal.

En una variación particular del método anterior, se llevan a cabo las etapas de a) hasta f) en un procedimiento iterativo de preparación de una nueva primera biblioteca de compuestos y/o una segunda biblioteca de compuestos y se seleccionan nuevamente hasta identificar una sonda candidata para formación de imágenes con propiedades optimizadas de enlazamiento, biodistribución, metabolismo y farmacocinética.

En un aspecto particular del método, se lleva a cabo el método con al menos una iteración. En una variación, se lleva a cabo el método con al menos 5 iteraciones, al menos 10 iteraciones o al menos 20 iteraciones hasta identificar una sonda candidata para formación de imágenes que tiene propiedades optimizadas de enlazamiento, biodistribución, farmacocinéticas, metabolismo y eliminación. En el método divulgado aquí, se define la afinidad de enlazamiento optimizada están en el rango nanomolar o mejor. Biodistribución y farmacocinéticas optimizadas significa que el compuesto alcanza al tejido objetivo *in vivo* y que permanece en el torrente sanguíneo durante un período de tiempo suficiente, tal como desde varios minutos hasta 2 horas en el caso de PET 18-F, por ejemplo, para permitir que el compuesto o la sonda para formación de imágenes se enlace con la biomolécula objetivo *in vivo*. Metabolismo optimizado significa que el compuesto o la sonda no se metabolizan con la formación de productos inactivos o, peor, los compuestos radiactivos o los iones que se dirigen a otros tejidos no deseados. Como ejemplo, si el compuesto pierde su radioactividad 18F, producirá una señal fuerte, indeseada por PET en el hueso. Propiedades optimizadas de eliminación significa que el compuesto o la sonda no enlazados, que no han alcanzado su tejido objetivo, son rápidamente eliminados del organismo (en un lapso de 2 - 3 horas a más tardar, en el caso de 18F), para producir una relación grande de la señal con respecto al fondo ("señal" significa la señal, por ejemplo radioactividad, que emana del compuesto enlazado).

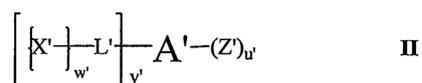
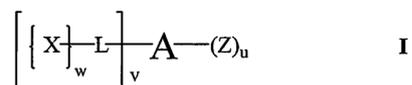
En otro aspecto del presente método, el primer sitio de enlazamiento es el sitio de enlazamiento de sustrato y el segundo sitio de enlazamiento es un sitio de enlazamiento del cofactor, o el primer sitio de enlazamiento es un sitio de enlazamiento del cofactor y el segundo sitio de enlazamiento es el sitio de enlazamiento del sustrato.

En una variación particular del método anterior, el grupo saliente puede ser convertido para formar un derivado marcado por medio de una reacción de intercambio, una reacción de sustitución nucleofílica, una reacción de sustitución electrofílica o por medio de la formación de un complejo con un metal radioactivo. En una variación particular del método, el grupo saliente se selecciona de entre el grupo que consiste de un grupo halo, hidroxilo, aciloxi, nitro y sulfonilo. Ejemplos específicos de un grupo saliente incluyen alcanilo (por ejemplo acetoxi, propionilo, etc.), sulfonilo (por ejemplo, mesilo, tosil, etc.), y similares.

En una variación particular del método, el compuesto ligando identificado es marcado con un isótopo radioactivo, y el compuesto ligando resultante se utiliza para los métodos de formación de imágenes seleccionados de entre el grupo que consiste de PET, SPECT y formación de imágenes ópticas. Para una aplicación particular del método anterior, el isótopo radioactivo es F-18. En una variación del método, el enlazamiento de los compuestos candidatos dentro de los sitios de enlazamiento de la enzima facilita la reacción de la química clic en ausencia de cualquier catalizador añadido en forma externa. En aún otra variación del método, la segunda biblioteca de compuestos candidatos incluye 1 o más compuestos. En una variación particular del método, la primera biblioteca de compuestos candidatos y la segunda biblioteca de compuestos candidatos cada una incluye independientemente al menos un compuesto, al menos cinco compuestos, al menos diez o más compuestos, o al menos 25 o más compuestos.

En otro aspecto del método anterior, la primera biblioteca de compuestos candidatos y/o la segunda biblioteca de compuestos candidatos incluyen además un enlazador entre el compuesto y el primer grupo funcional y/o un enlazador entre el compuesto y el segundo grupo funcional. En una variación, el enlazador incluye entre 1 y 10 átomos en la cadena enlazadora entre el compuesto y el grupo funcional.

- 5 En otra modalidad, se provee un método de acuerdo con lo anterior, en donde la primera biblioteca de compuestos candidatos incluye compuestos de la fórmula I, y la segunda biblioteca de compuestos candidatos incluye compuestos la fórmula II:



- 10 en donde: A y A' son independientemente cada uno una imitación de sustrato seleccionada de entre el grupo que consiste de un grupo arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido, una imitación de un sustrato no peptídico, imitaciones de un grupo arginina y un peptidomimético; L y L' son independientemente cada uno un enlace o un grupo de enlazamiento que contiene 1 a 10 átomos en la cadena de enlazamiento, opcionalmente sustituidos por 0 - 3 sustituyentes; X y X' son independientemente cada uno un grupo funcional complementario de química clic; Z y Z' son independientemente cada uno un NH₂, hidrazinilo, hidrazinilo sustituido, y opcionalmente urea sustituida, o están ausentes; U y U' son independientemente cada uno 0, 1, 2 ó 3; V y V' son independientemente cada uno 1, 2 ó 3; y W y W' son independientemente cada uno 1, 2 ó 3.

- 20 En cada uno de los aspectos anteriores de la divulgación como se describió aquí, incluidos todos los aspectos, modalidades y variaciones y ejemplos representativos, se pretende que sean intercambiables según el caso, de tal manera que los diferentes aspectos, modalidades y variaciones puedan ser combinados en forma intercambiable y en diferentes permutaciones. Por ejemplo, una primera estructura molecular particular que comprende un primer grupo funcional sin un enlazador puede experimentar una reacción de cicloadición 1,3-dipolar con una segunda estructura molecular con un grupo funcional complementario sin un enlazador, o alternativamente, la misma primera estructura molecular que comprende al grupo funcional con un enlazador puede experimentar una reacción de cicloadición 1,3-dipolar con una segunda estructura molecular que comprende un grupo funcional complementario que contiene un enlazador entre la estructura molecular y el grupo funcional complementario. Se pretende que estas y otras permutaciones y variaciones estén incluidas en los aspectos de la invención.

- 30 La concentración del reactivo es un parámetro importante, ya que influye sobre la velocidad de ambas reacciones inducidas por la enzima (es decir, la reacción deseada *in situ*) así como aquella de la reacción de fondo libre de enzima. Por razones prácticas, es deseable mantener bajas las concentraciones de reactivos con el propósito de minimizar el grado de la reacción de fondo, de modo que la formación de producto con base en la enzima pueda ser identificada más fácilmente. Al mismo tiempo, la concentración de la molécula de anclaje debe ser suficientemente alta para lograr una saturación significativa del sitio de enlazamiento para uso óptimo de la enzima disponible. Es preferible utilizar una molécula de anclaje y concentraciones de enzima que sean suficientemente altas para lograr una saturación del sitio activo del 95% o superior. El último componente de la reacción, la imitación del sustrato, debe estar disponible en concentraciones suficientemente altas para permitir que tenga lugar la reacción bimolecular entre el complejo enzima/molécula de anclaje y la imitación del sustrato con velocidades razonables. Típicamente, la concentración de la imitación del sustrato será al menos de 400 μM. Las concentraciones pueden ser ajustadas hacia arriba o hacia abajo, de tal manera que la reacción de fondo resulte muy rápida o si se encuentran muy pocos éxitos *in situ*.

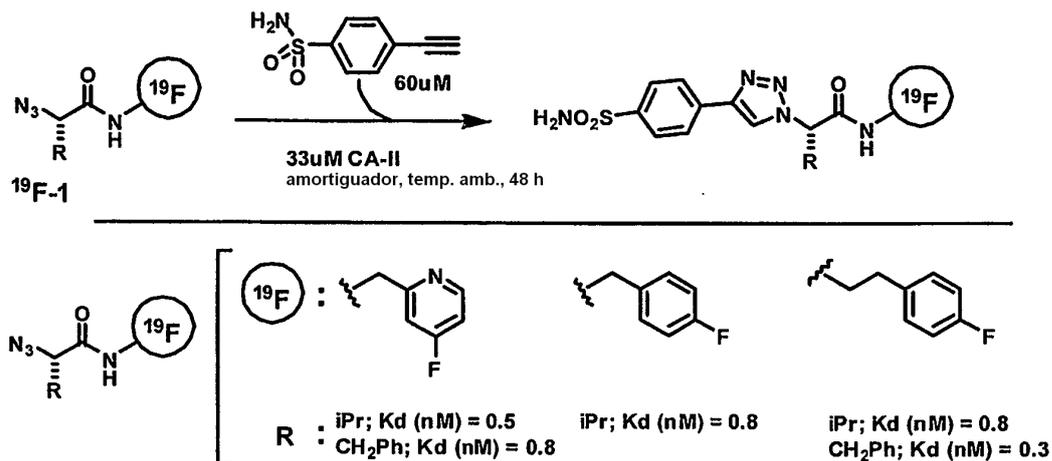
- 40 Cada combinación reactivo/enzima puede ser analizada por medio de espectrometría de masas - LC para identificar productos triazol, que son éxitos potenciales *in situ*. Se pueden llevar a cabo diferentes análisis para validar estos éxitos potenciales *in situ*, determinando si éstos fueron formados o no por la enzima: (a) los experimentos de control con BSA y sin enzima puede identificar falsos positivos; (b) la inhibición competitiva de la formación de producto *in situ* en presencia de inhibidores enzimáticos conocidos (por ejemplo, etoxazolamida en el caso de CA-II) puede revelar si un éxito dado se forma en o cerca del sitio activo de la enzima. Los éxitos validados *in situ* pueden ser sintetizados químicamente y caracterizados en ensayos biológicos para determinar sus afinidades de enlazamiento. El patrón de sustitución del triazol, ya que la enzima puede formar ya sea el isómero 1,4-disustituido o el 1,5-disustituido, también puede ser determinado. Esto puede ser logrado haciendo referencia a compuestos que utilizan la reacción azida/acetileno catalizada con Cu^I, que provee triazoles 1,4-disustituidos, la reacción azida/acetileno catalizada con Ru^{II}, que provee triazoles 1,5-disustituidos o la reacción térmica de cicloadición, que produce mezclas de triazoles 1,4- y 1,5-disustituidos.

Muchas modificaciones y otras modalidades de la invención vienen a la mente de alguien capacitado en el arte a la cual pertenece esta invención que tiene el beneficio de las enseñanzas presentadas en la descripción anterior. Por lo tanto, se entiende que la invención no está limitada a las modalidades específicas divulgadas y se pretende que las modificaciones y otras modalidades estén incluidas dentro del alcance de la invención. Aunque se emplean términos específicos aquí, éstos son utilizados en un sentido genérico y descriptivo únicamente y no para propósitos de limitación.

5

Ejemplos

SELECCIONES IN SITU DE CA-II



General. Se utilizó anhidrasa carbónica II de eritrocitos de bovino (Sigma-Aldrich, catálogo número C2522; lote número 083K9295, 4.014 unidades/mg de Wilbur-Anderson, contenido de proteína del 90% por Biuret) para experimentos de química clic *in situ* y para la determinación de constantes de enlazamiento. Ensayamos la proteína por medio de electroforesis en gel de SDS y se encontró que presenta una sola banda correspondiente a 29 - 30.000 unidades de peso molecular. Se utilizó anhidrasa carbónica II de eritrocitos humanos (Sigma Aldrich, catálogo número C-6165, 4.260 unidades/mg de Wilbur-Anderson) para la determinación de afinidades de enlazamiento para la enzima humana. Todas las mediciones de fluorescencia fueron realizadas en un lector de placas de fluorescencia SPECTRA MAX GEMINI a 37 °C. Los análisis de LC/MS fueron realizados en un Agilent 1100 series LC/MSD (SL) utilizando una columna C8 Zorbax de 30 X 2,1 mm con una precolumna C18 Phenomenex. Se logró la detección del compuesto por medio de espectroscopía de masas por electroaspersión en modo de ión positivo seleccionado (LC/MS-SIM). Los solventes de elución, acetonitrilo y agua, contenían TFA al 0,05%.

Procedimiento general para experimentos de química clic *in situ*

Se prepararon soluciones patrón de azidas 19F-1 (20 mM), etoxazolamida (20 mM) y etilil bencenosulfonamida (2 mM) en DMSO. Se añadió alquileo (3 μL) a pozos de placas de microtitulación de 96 pozos, que contienen la enzima (94 μL de una solución de 1 mg/mL, preparada a partir de la proteína comercial con una pureza del 90% por medio de disolución en amortiguador de fosfato de potasio 250 mM pH 7,4), seguido por el reactivo azida (2 μL) y DMSO (1 μL). Se almacenó la placa de reacción a 37 °C durante 40 horas.

Las concentraciones finales de reactivo eran las siguientes:

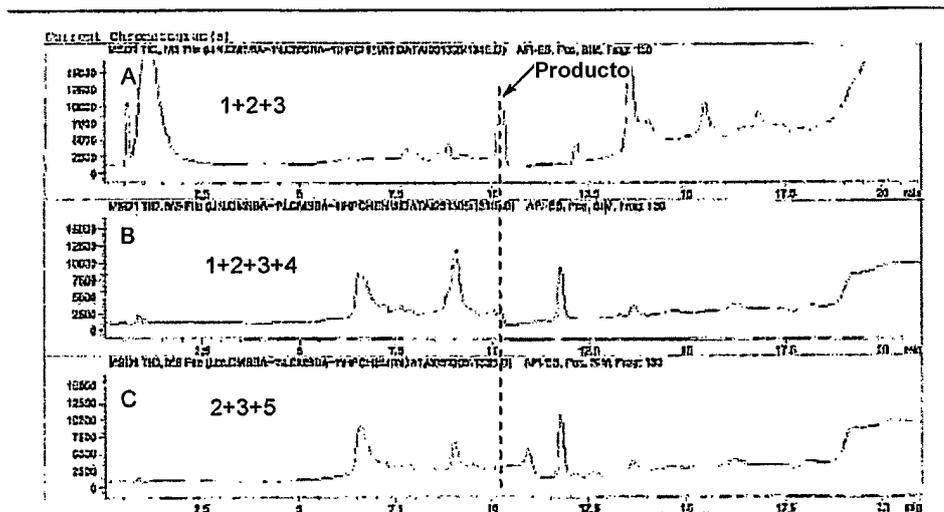
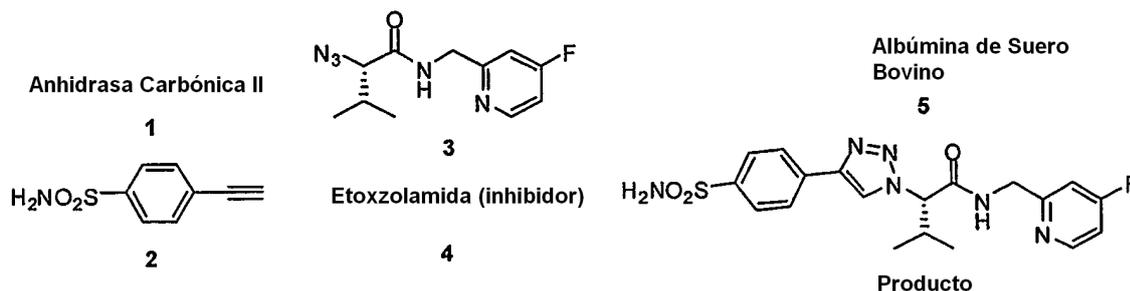
Enzima (29 μM), alquino (60 μM), azida (400 μM) y DMSO (6% en vol.). Al mismo tiempo, se realizaron y sometieron diferentes reacciones de control a condiciones experimentales análogas: (1) Control de inhibición competitiva con etoxazolamida (1 μL , concentración final 200 μM); (2) control de enlazamiento de proteína no específica utilizando albumina de suero bovino en lugar de bCAII (concentración final de 1 mg/mL). En algunos casos, también llevamos a cabo experimentos de control "sin proteína", utilizando amortiguador de pH 7,4 en vez de bCA-II. Análisis de LC/MS-SIM: Todas las muestras fueron analizadas por medio de HPLC en fase reversa con detección espectroscópica de masas por electroaspersión en el modo de ión positivo seleccionado. El volumen de inyección fue de 30 μL con una velocidad de flujo de 0,3 mL/min. Se empleó el siguiente gradiente de elución: 0 - 100% de acetonitrilo/0,05% de TFA y agua/0,05% de TFA durante 16 minutos, 100% de acetonitrilo/0,05% de TFA durante 2 minutos, seguido por 100 - 0% de acetonitrilo/0,05% de TFA y agua/0,05% de TFA durante 3 minutos. El tiempo de corrimiento posterior fue de 2 minutos.

Ensayo de enlazamiento *in vitro* para anhidrasa carbónica II de bovino/humano:

General. Se utilizó el ensayo de competición de fluorescencia desarrollado por Whitesides et al. (J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 5057) y J. C. Kemohan (J. Biol. Chem. 1967, 242, 5813) usando DNSA como un ligando de reporte que es desplazado por el compuesto de prueba para la medición de afinidades de enlazamiento. El ensayo está basado en la observación de que la única señal de fluorescencia detectada a 460 nm después de excitación a 290 nm, un mínimo de absorción para DNSA, es aquella del complejo DNSA•CA. Aumentando la concentración de la muestra, disminuye la intensidad de la fluorescencia debido a DNSA•CA como resultado de la competición con el compuesto de prueba, permitiendo la determinación de constantes de disociación a partir de los gráficos de Scatchard. Esto último fue desarrollado para compuesto de prueba utilizando balance de masas para calcular las concentraciones de CA enlazado a DNSA [CA•DNSA], enlazado a la muestra no fluorescente [CA•Inh] y CA libre [CA] en solución con base en la constante de disociación Kd para DNSA de 0,39 μM (determinado por medio de experimentos de titulación) y la concentración total de la enzima (0,18 μM). Condiciones del ensayo: Se añadieron cantidades crecientes de los compuestos de prueba (desde 10 nM hasta 10000 nM, soluciones patrón elaboradas en DMSO) a una solución de DNSA (20 μM) y CA-II humana o de bovino (180 nM) en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 7,4 en una placa de microtitulación de 96 pozos. Se mezclaron e incubaron las soluciones a temperatura ambiente durante 1 h antes de determinar los cambios en la intensidad de la fluorescencia sobre un lector de placas de fluorescencia (longitud de onda de excitación a 290 nm longitud de onda de emisión a 460 nm). Se determinaron los valores de Kd a partir de los gráficos de Scatchard utilizando la siguiente ecuación descrita por Whitesides et al.

$$[CA \cdot Inh] / [CA]_{tot} \cdot [Inh] = K_{11inh} - K_{11inh} \{ [CA \cdot Inh] + [CA \cdot DNSA] \} / ([CA]_{tot})$$

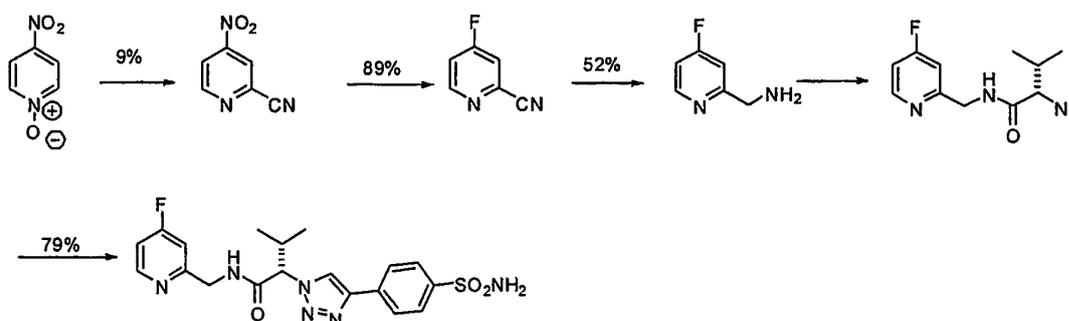
Los términos [CA•DNSA], [CA•Inh], y CA libre fueron calculados utilizando el balance de masas con base en los valores conocidos para la constante de disociación de CA•DNSA y la concentración total de CA en cada reacción. Se determinó que las constantes de disociación (Kd) de CA•DNSA eran de 0,425 μM contra anhidrasa carbónica II y de 0,393 μM contra anhidrasa carbónica II bovina, por medio de titulación de la enzima respectiva (200 nM en amortiguador de fosfato pH 7,4) con DNSA (desde 200 hasta 1000 nM, solución patrón elaborada en DMSO) y registrando el cambio en fluorescencia. Estos valores son muy similares a los valores reportados.



Las Figuras A, B y C son cromatogramas SIM/MS de alícuotas tomadas de una selección típica. En este caso, se identificó el producto como un éxito *in situ*. El ensayo de enlazamiento reveló que la Kd del compuesto era de 0,5 nM. La Figura A es una alícuota de una mezcla de incubación de anhidrasa carbónica II (1), la molécula de anclaje (2) y el fragmento de azida (3). La línea punteada representa el tiempo de retención para el ligando recientemente formado. La Figura B es una alícuota de una mezcla de incubación de anhidrasa carbónica II (1), la molécula de anclaje (2), el fragmento de azida (3) y un inhibidor de anhidrasa carbónica II (4). La Figura C es una alícuota de una

mezcla de incubación de albúmina de suero bovino (5), la molécula de anclaje (2) y el fragmento de azida (3). La Figura A revela que el ligando se forma a través de moldeamiento por la enzima. La Figura B revela que en presencia de un inhibidor conocido, no se forma el ligando deseado, soportando por lo tanto la aseveración de que la formación del ligando es moldeada por la enzima. Y la Figura C revela que en ausencia de CA-II, no se forma ligando. Este candidato para formación de imágenes moleculares fue escogido por radiomarcación debido a la facilidad de desplazamiento de grupos para-nitro por fluoruro ^{18}F en andamiajes de piridina.

General:



La síntesis de 4-nitro-2-ciano piridina fue llevada a cabo de acuerdo con un procedimiento conocido de la literatura (J. Organomet. Chem. 1997, 544, 163 - 174). La preparación de 4-fluoro-2-ciano piridina fue llevada a cabo de acuerdo con un procedimiento conocido de la literatura (Org. Lett. 2005, 7, 577 - 579).

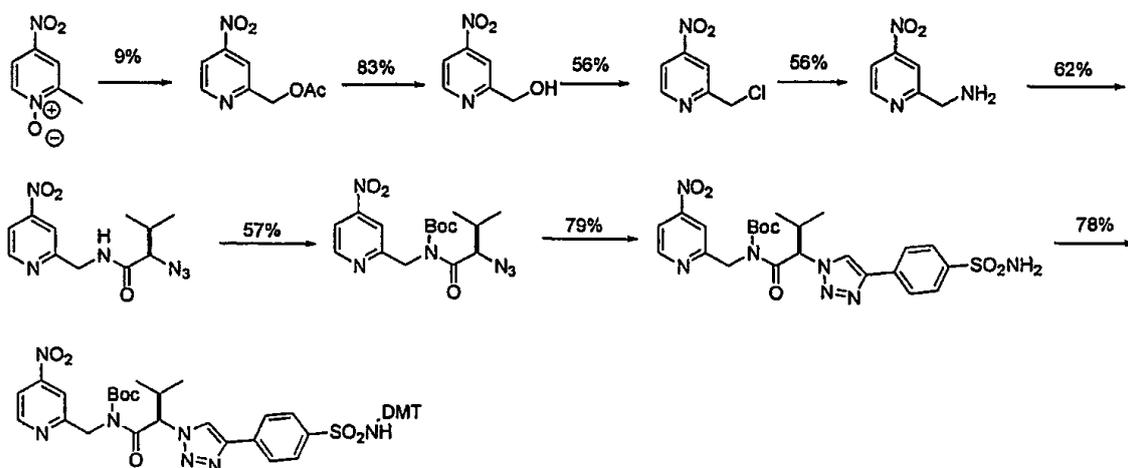
Síntesis de 4-fluoro-2-aminometil piridina

A un matraz de fondo redondo se le añadió 4-fluoro-2-ciano piridina (278 mg, 2,3 mmol) en THF (10 mL) BH_3 -THF (1 M, 6 mL, 6 mmol). Se sometió a reflujo la reacción durante 15 min. Se enfrió luego la reacción hasta temperatura ambiente y se añadió HCl (30 mL) con ventilación. Se lavó la capa acuosa con Et_2O (3 veces). Se tornó básica la capa acuosa con NaOH (acuosa al 15%) y se extrajo con un volumen mínimo de CH_2Cl_2 . Se lavaron las capas orgánicas combinadas con salmuera, se secó (MgSO_4), se filtró y concentró hasta sequedad en un baño de agua fría para producir 150 mg de un aceite claro incoloro.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 4.0 (2H, s), 6.85 - 6.95 (1H, m), 7.06 (1H, dd, $J = 6.0, 3.0$ Hz), 8.46-8.5 (1H, m) NH_2 no observado por RMN ^{19}F (300 MHz, C_6F_6) δ : 64.178

Acoplamiento de 4-Fluoro-2-aminometil piridina con ácido L-valina azida

Al ácido L-valina azida (0,038g, 0,268 mM, 1 eq.) en un vial de vidrio disuelto en THF (1mL), con agitación a temperatura ambiente se le añadió 4-fluoro-2-metilaminopiridina (0,04 g, 0,317 mM, 1,2 eq.), seguido por trietilamina (0,243 mL, 1,748 mM, 5 eq.), EDC (0,085g, 0,559 mM, 1,6 eq.), y HOBt (0,076 g, 0,559 mM, 1,6 eq.) y se dejó que reaccionara durante 6 h. Después de que se completó la reacción, se la detuvo con agua y se extrajo con acetato de etilo. Se lavó la capa orgánica con agua seguido por bicarbonato de sodio, salmuera y luego se secó sobre MgSO_4 . Después de filtrar la capa orgánica y concentrarla hasta sequedad, se purificó la mezcla de reacción por medio de cromatografía en columna utilizando acetato de etilo/hexanos como solvente de elución (cargado en Hex/ EtOAc en proporción 80/20 eluido con 100 ml, luego se incrementó hasta una proporción de 50/50 de Hex/ EtOAc). Se aisló el producto como un aceite incoloro (0,021 g, 32%).



Síntesis de 4-nitro-2-acetoximetil piridina

A un matraz de fondo redondo que contenía anhídrido acético (80 mL) a 90 °C, se le añadió N-óxido de 4-nitro-2-metil piridina (10 g). La reacción fue mantenida a 120°C durante la noche. Se concentró luego la reacción hasta sequedad. Se purificó la mezcla de reacción sobre gel de sílice utilizando hexanos (para remover el anhídrido acético en exceso) seguido por Et₂O:Hex al 30% (para remover la 4-acetoxi-2-acetoximetil piridina) seguido por Et₂O:Hex al 50% para producir 3,5 g (27,5%) de un sólido de color amarillo.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 2.24 (3H, s), 5.37 (2H, s), 7.97 - 8.00 (1H, m), 8.09 (1H, s), 8.91 (1H, d, J = 6.0 Hz)

MS (Electroaspersión): 197 (M+H), 155 (M-OAc)

Síntesis de 4-nitro-2-hidroximetil piridina

A un matraz de fondo redondo que contenía 4-nitro-2-acetoximetil piridina (856 mg, 4,4 mmol) se le añadió HCl (1 N, 20 mL, 20 mmol). Se calentó la mezcla de reacción a 50°C durante la noche. Se vertió luego la mezcla de reacción sobre Et₂O. Se lavó la capa acuosa con Et₂O. Se trató luego la capa acuosa con Na₂CO₃ y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 veces). Se secaron las capas orgánicas combinadas (MgSO₄), se filtró y se concentró hasta sequedad para producir 561 mg (83,4%) de un aceite claro de color amarillo.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 2.05 - 2.55 (1H, br s), 4.95 (2H, s), 7.97 (1H, dd, J = 6.0, 3.0 Hz), 8.10 (1H, s), 8.89 (1H, d, J = 6.0 Hz)

MS (Electroaspersión): 155 (M+H)

Síntesis de 4-nitro-2-clorometil piridina

A un matraz de fondo redondo que contenía alcohol (562 mg, 3,65 mmol) y CH₂Cl₂ (5 mL) a 0 °C se le añadió SOCl₂ (3,65 mL, 7,3 mmol). Se agitó la reacción a 0 °C durante 2 h. Se vertió la reacción sobre NaHCO₃ saturado y se extrajo en CH₂Cl₂. Se secaron las capas orgánicas combinadas (MgSO₄), se filtró y se concentró hasta sequedad. Se purificó la mezcla de reacción sobre gel de sílice utilizando Et₂O:Hex en proporción 1:1 como el eluyente para producir 350 mg (55,8%) de un sólido de color amarillo.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 4.83 (1H, s), 8.01 (1H, dd, J = 6.0, 3.0 Hz), 8.27 (1H, s), 8.90 (1H, d, J = 6.0 Hz)

Síntesis de 4-nitro-2-metilamino piridina

A un matraz de fondo redondo que contenía 4-nitro-2-clorometil piridina (350 mg, 2,03 mmol) se le añadió hexametenotetramina (285 mg, 2,03 mmol) y CHCl₃ (5 mL). Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante la noche. Se retiró por filtración el ppt resultante y se lavó con Et₂O para producir 400 mg de un sólido de color blanco. Se disolvió luego el sólido en EtOH (7 mL) y se lo trató con HCl (concentrado, 0,5 mL). Se calentó la mezcla de reacción a 90 °C durante 2 h. Se concentró luego la reacción hasta sequedad, se la vertió sobre agua, se lavó con Et₂O. Se tornó luego básica la capa acuosa por medio de la adición de Na₂CO₃. Se extrajo el producto en CH₂Cl₂. Se secaron las capas orgánicas combinadas (MgSO₄), se filtró y se concentró hasta sequedad para producir 175 mg de un aceite claro incoloro.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.6-1.8 (2H, br s), 4.2 (2H, s), 7.9 (1H, dd, J = 6.0, 3.0 Hz), 8.15 (1H, s), 8.83 (1H, d, J = 6.0 Hz)

MS (Electroaspersión): 154 (M+H)

Síntesis de 2-Azido-3-metil-N-(4-nitro-piridin-2-ilmetil)-butiramida

5 A un matraz de fondo redondo que contenía 4-nitro-2-metilamino piridina (175 mg, 1,14 mmol) se le añadió THF (5 mL), Et₃N (1,6 mL, 11,4 mmol), 2-Azido-3-metil-butiril azida (164 mg, 1,14 mmol), EDC (278 mg, 1,83 mmol) y HOBt (247 mg, 1,83 mmol). Se agitó la reacción durante la noche a temperatura ambiente. Se vertió luego la reacción sobre HCl (1 N, 20 mL) y se extrajo en EtOAc. Se lavaron las capas orgánicas combinadas con NaHCO₃ saturado, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró hasta sequedad para producir 197 mg (61,8%) de un sólido de color marrón claro.

10 RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 0.96 (3H, d, J = 6.0 Hz), 1.14 (3H, d, J = 6.0 Hz), 2.39-2.50 (1H, m), 3.4 - 3.7 (1H, br s), 4.76 (2H, d, J = 6.0 Hz), 7.97 (1H, dd, J = 6.0, 3.0 Hz), 8.02 (1H, s), 8.90 (1H, d, J = 6.0 Hz)

MS (Electroaspersión): 279 (M+H), 301 (M+Na)

Síntesis de éster tert-butílico del ácido (2-Azido-3-metil-butiril)-(4-nitro-piridin-2-ilmetil)-carbámico

15 A un matraz de fondo redondo que contenía la azida de partida (400 mg, 1,44 mmol) se le añadió CH₃CN (10 mL), Boc₂O (470 mg, 2,16 mmol) y DMAP (9 mg, 0,07 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se vertió luego la reacción sobre agua y se extrajo en EtOAc. Se secaron las capas orgánicas combinadas (MgSO₄), se filtró y concentró hasta sequedad. Se purificó el residuo sobre gel de sílice utilizando Hex:Et₂O en proporción 2:1 como el eluyente para producir 309 mg (57%) de un sólido de color blanco.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 1.03 (3H, d, J = 9 Hz), 1.07 (3H, d, J = 6.0 Hz), 1.41 (9H, s), 2.23 - 2.39 (1H, m), 5.30 (2H, s), 7.89 - 7.96 (2H, m), 8.81 (1H, d, J = 6.0 Hz)

20 MS (Electroaspersión): 379 (M+H), 401 (M+Na)

Síntesis de éster tert-butílico del ácido {3-Metil-2-[4-(4-sulfamoil-fenil)-[1,2,3]triazol-1-il]-butiril)-(4-nitro-piridin-2-ilmetil)-carbámico

25 A un matraz de fondo redondo que contenía la azida (300 mg, 0,79 mmol), tBuOH (3 mL), 4-etino-bencenosulfonamida (144 mg) se le añadió CuSO₄ (0,04 M, 1,5 mL) y ascorbato de sodio (0,1 M, 1,2 mL). Se agitó la reacción durante la noche bajo atmósfera de argón. Se vertió luego la reacción sobre agua y se extrajo en EtOAc. Se lavaron las capas orgánicas combinadas con NH₄OH al 5%, se secó (MgSO₄), se filtró y concentró hasta sequedad. Se purificó el residuo sobre gel de sílice utilizando primero EtOAc:Hex al 30% para eluir los reactivos de partida seguido por EtOAc:Hex en proporción 1:1 para producir 350 mg 78,8% de un sólido de color blanco.

30 RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 0.90 (3H, d, J = 6.0 Hz), 1.12 (3H, d, J = 6.0 Hz), 1.55 (9H, s), 2.59 - 2.71 (1H, m), 3.40 - 3.50 (2H, br s), 4.78 (2H, s), 6.87 (1H, d, J = 9.0 Hz), 7.88 - 7.91 (2H, m), 7.98 - 8.03 (4H, m), 8.28 (1H, s), 8.75 (1H, d, J = 6.0 Hz)

MS (Electroaspersión): 506 (M+H)

Síntesis de éster tert-butílico del ácido {2-[4-(4-{[Bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metil]-sulfamoil}-fenil)-[1,2,3]triazol-1-il]-3-metil-butiril)-(4-nitro-piridin-2-ilmetil)-carbámico.

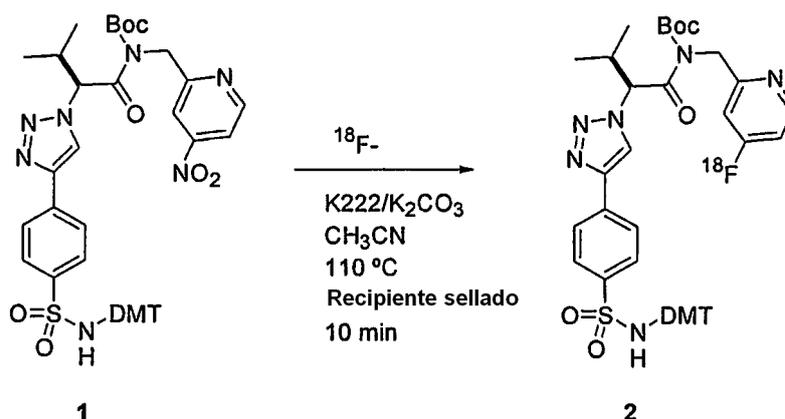
35 A un matraz de fondo redondo que contenía el triazol (350 mg, 0,63 mmol), CH₂Cl₂ (5 mL) y TEA (436 µL) se le añadió DMT-Cl (318 mg, 0,94 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 1 h. La TLC (EtOAc:Hex en proporción 1:1) indicó el consumo completo del material de partida. Se vertió luego la reacción sobre agua y se extrajo en EtOAc. Se secaron las capas orgánicas combinadas (MgSO₄), se filtró y concentró hasta sequedad. Se purificó el residuo sobre gel de sílice utilizando EtOAc:Hex al 30% para eluir el material que corría más rápido
40 seguido por EtOAc:Hex al 40% para producir 417 mg (77%) de un sólido de color amarillo.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 0.90 (3H, d, J = 6.0 Hz), 1.12 (3H, d, J = 6.0 Hz), 1.56 (9H, s), 2.57 - 2.71 (1H, m), 3.71 (6H, s), 5.75 (2H, s), 6.61 - 6.71 (2H, m), 6.85 (1H, d, J = 9.0 Hz), 7.18 - 7.26 (5H, m), 7.33 - 7.37 (1H, m), 7.65 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.98 - 8.03 (2H, m), 8.20 (1H, s), 8.75 (1H, d, J = 6.0 Hz)

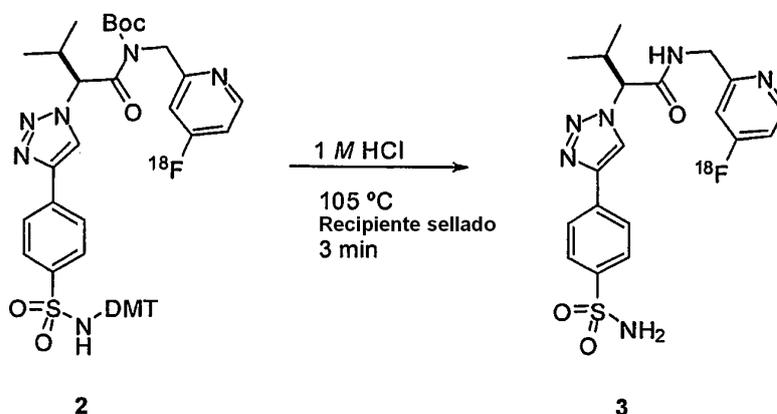
MS (Electroaspersión): 862 (M+H)

45 Radiomarcación del compuesto

Experimento con anhidrasa carbónica marcada con F18



Se irradió agua con oxígeno-18 utilizando protones a 11 MeV (RDS-111 Eclipse, Siemens Molecular Imaging) para generar ion fluoruro [¹⁸F] de la forma usual. Al final del bombardeo, el agua [¹⁸O] que contenía ion fluoruro [¹⁸F] fue transferida desde el objetivo de tantalio hasta un módulo de fluoración nucleofílica automatizado (explora RN, Siemens Biomarker Solutions). Bajo control computarizado, se transfirió la solución de agua [¹⁸O]/ion fluoruro [¹⁸F] a una columna pequeña de resina de intercambio aniónico (Chromafix 45-PS-HCO₃, Machery-Nagel) que había sido previamente lavada con agua (5 mL), bicarbonato de potasio acuoso (0,5 M, 5 mL), y agua (5 mL). Se recuperó el agua [¹⁸O] (1,8 mL) para purificación y reutilización posterior. Se eluyó el ion fluoruro [¹⁸F] atrapado en el recipiente de reacción con una solución de carbonato de potasio (3,0 mg) en agua (0,4 mL). Se añadió una solución de Kryptofix 222 (20 mg) en acetonitrilo (1,0 mL), y se calentó la mezcla (70 a 95°C) al vacío y una corriente de argón para evaporar el acetonitrilo y el agua. Después de enfriar, se añadió al residuo de ion fluoruro [¹⁸F] reactivo "seco", K222, y carbonato de potasio, una solución de 4- nitropiridina-N-BOC-valina-N-dimetoxitritil-bencenosulfonamida (**1**, 17 mg, 19,7 μmol) in acetonitrilo (1,0 mL). Se calentó la mezcla de reacción a 110 °C en un recipiente sellado (P_{máx.} = 2,3 bar) durante 10 minutos con agitación (magnética). Se enfrió la mezcla a 55 °C y se evaporó la mayor parte del acetonitrilo al vacío y una corriente de argón como anteriormente.



Al intermediario fluorado [¹⁸F] protegido crudo (**2**) se le añadió ácido clorhídrico acuoso (1,0 M, 1,0 mL), y se calentó la mezcla a 105 °C durante 3 minutos. Después de enfriar a 35 °C, se añadió acetato de sodio acuoso (2,0 M, 0,5 mL) con agitación. Se transfirió la mezcla de reacción a un bucle para la muestra (1,5 mL), e inyectó sobre una columna de HPLC semipreparativa (Phenomenex Gemini 5μ C18, 250 x 10 mm, fase móvil de 25% de acetonitrilo, 75% de agua, ácido trifluoroacético al 0,05%, 5,0 mL/min). El producto 4-[¹⁸F]fluoropiridina-valina-bencenosulfonamida (**3**, [¹⁸F]FPVBS) eluyó a 15 - 16 minutos de acuerdo a lo monitoreado por medio de la detección de la radiación que fluyó a través y UV (254 nm). El eluato de la HPLC que contenía el producto (7 - 8 mL) fue recolectado en un vial de 30 mL con una barra de agitación magnética, y se añadió agua (20 mL). Se mezcló completamente la solución acuosa y luego se la pasó a través de una Sep-Pak C18 con la solución de agua/fase móvil yendo hacia una botella de residuos. Se lavó la Sep-Pak C18 con una alícuota adicional de agua (20 mL). Se eluyó luego el producto de la Sep-Pak C18 con etanol (1,0 mL) que fue pasado a través de un filtro estéril 0,22 μm hasta un vial estéril. Se añadió luego agua (9,0 mL) al vial con el producto estéril a través del filtro estéril para producir una concentración de etanol del 10%.

Una corrida típica de producción arrancando con aproximadamente 900 mCi de ion fluoruro [¹⁸F] produjo 91 mCi (136 mCi con EOB, rendimiento del 15 %) de producto aislado después de 64 minutos de síntesis, purificación por HPLC y extracción en fase sólida C18 y reconstitución en etanol al 10%.

Se analizó el producto recolectado por HPLC (Phenomenex Gemini 5 μ C18, 150 x 4,6 mm, fase móvil de 25% de acetonitrilo, 75% de agua, ácido trifluoroacético al 0,05%, 1,0 mL/min). Como se monitoreó por medio de la radioactividad y detección con UV (254 nm), este producto tenía un tiempo de retención de 12 minutos y una pureza radioquímica del 99,4%.

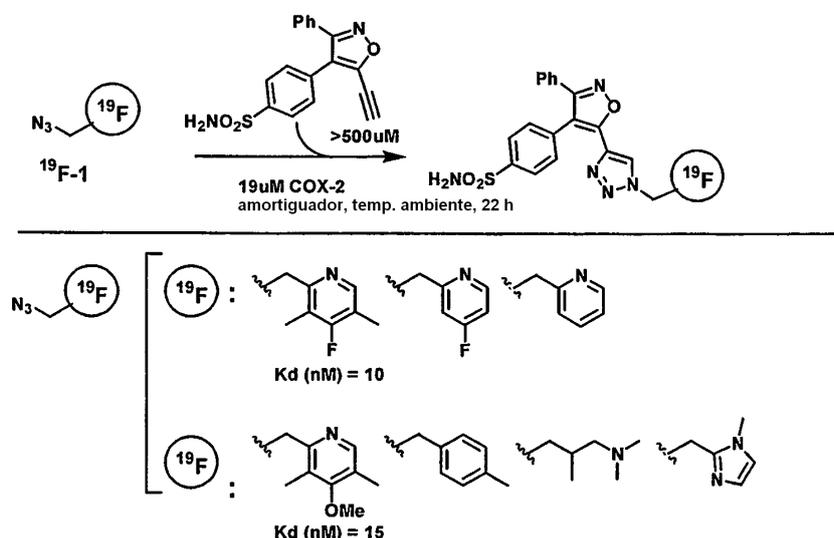


IMAGEN DE PET: PET/CT estático durante 2 h de un ratón normal.

5

El agente para formación de imágenes CA-II marcado con ^{18}F se enlaza preferencialmente a los pulmones, riñones y la sangre correlacionándose bien con sus altos niveles de expresión de CA-II.

Selecciones *in situ* de COX-2



10 General. Se utilizó una enzima recombinante humana COX-II aislada de un sistema de sobreexpresión de Baculovirus en células Sf21 (compañía Cayman Chemical, catálogo número 60122), 24.016 Unidades/mg (diluida hasta una concentración final de 7 μM en la reacción).

15 Para un ensayo de actividad *in vitro* se utilizó un kit colorimétrico para ensayo de selección del inhibidor de COX-2 (Ovino) de la compañía Cayman Chemical (catálogo número 760111). Todas las mediciones de absorbancia fueron realizadas en un lector de placas SPECTRA MAX M2 a 28°C. Los análisis de LC/MS fueron realizados en un LC/MSD (SL) serie 1100 de Agilent utilizando una columna C18 Zorbax de 30 X 2,1 mm con una precolumna C18 Phenomenex. Se logró la detección del compuesto por medio de espectroscopía de masas por electroaspersión en modo de ion positivo seleccionado (LC/MS-SIM). Los solventes de elusión, acetonitrilo y agua, contenían TFA al 0,05%.

Procedimiento general para la síntesis de triazoles 1,4-disustituidos ("anti"):

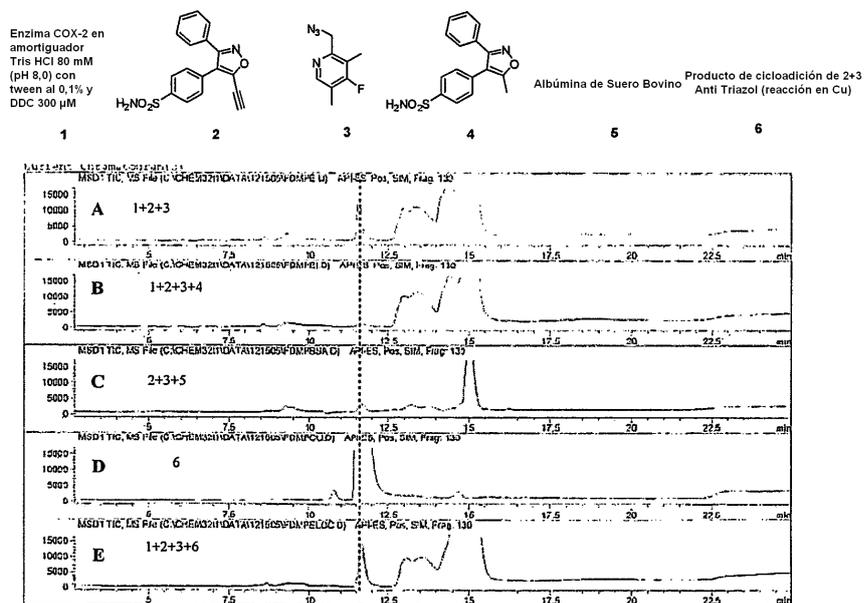
Una mezcla de alquino (1eq.) y azida (1eq.) en tert-butanol (0,400mL) reaccionó durante la noche a temperatura ambiente en presencia de CuSO₄ (solución 0,04 M en amortiguador de fosfato pH 7,4, 7,5% en moles), ascorbato de sodio (solución 0,1 M en amortiguador de fosfato pH 7,4, 15% en moles). Se vertió la mezcla de reacción sobre agua (unos pocos ml) y se extrajo con acetato de etilo, se lavó con hidróxido de amonio acuoso al 5%, se secó sobre MgSO₄ y concentró para producir triazol puro al 98 - 99% como un sólido de color blanco. El rendimiento no optimizado fue del 40%. Se realizó la cromatografía sobre algunos compuestos impuros (pureza menor al 90%) utilizando una mezcla de acetato de etilo:hexano como eluyente para la purificación.

Procedimiento general para experimentos de química clic *in situ*:

Se prepararon soluciones patrón de azidas (20 mM), Valdecoxib (20 mM) y alquino (3 mM) en DMSO. Se añadió el alquino (1 µL) a tubos eppendorf (volumen 0,5 mL) que contenían la enzima (47,5 µL de enzima recombinante humana COX-2 comercialmente disponible de la compañía Cayman Chemical), seguido por el reactivo azida (1 µL) y DMSO (0,5 µL). Se almacenó la placa de reacción a 37 °C durante 18 - 20 horas. Las concentraciones finales de reactivo eran las siguientes: Enzima (7 µM), alquino (60 µM), azida (400 µM) y DMSO (5% en volumen).

Al mismo tiempo, se establecieron y sometieron las reacciones de control a condiciones experimentales análogas: (1) Control de inhibición competitiva con Valdecoxib (1 µL, concentración final 200 µM); (2) Experimentos de control de albúmina de suero bovino, utilizando 1 mg/mL de BSA en amortiguador Tris-HCl 100 mM (pH 8,0) con DDC 300 µM.

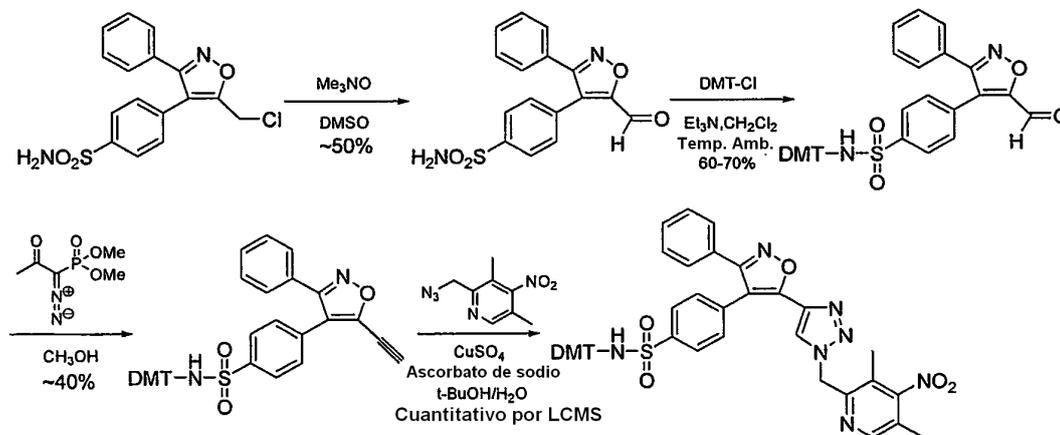
Análisis por LC/MS-SIM: Se analizaron todas las muestras por medio de HPLC en fase reversas con detección espectroscópica de masas con electroaspersión en el modo de ion positivo seleccionado. El volumen de inyección fue de 15 µL con una velocidad de flujo de 0,3 mL/min. Se emplearon los siguientes gradientes de elución: 10-100% de Acetonitrilo/TFA al 0,05% y agua/TFA al 0,05% durante 20 minutos, 100% de acetonitrilo/TFA al 0,05% durante 2 minutos seguido por 100-10% de acetonitrilo/TFA al 0,05% y agua/TFA al 0,05% durante 3 minutos. El tiempo de corrimiento posterior fue de 3 minutos.



Las Figuras A, B, C, D y E son cromatogramas de SIM/MS de alícuotas tomadas de una selección típica. En este caso, el producto 6 fue identificado como un éxito *in situ*. El ensayo de enlazamiento reveló que el Kd del compuesto era aproximadamente de 10 nM. La Figura A es una alícuota de una mezcla de incubación de COX-2 (1), la molécula de anclaje (2) y el fragmento de azida (3). La línea punteada representa el tiempo de retención para el ligando recientemente formado. La Figura B es una alícuota de una mezcla de incubación de COX-2 (1), la molécula de anclaje (2), el fragmento de azida (3) y un inhibidor de COX-2, Valdecoxib (4). La Figura C es una alícuota de una mezcla de incubación de albúmina de suero bovino (5), la molécula de anclaje (2) y el fragmento de azida (3). La Figura D es la inyección del producto crudo reunido por el acoplamiento de (2) y (3) en presencia de Cu(I). La Figura E es una inyección conjunta de (6) en la reacción en la Figura A para verificar la presencia de (6). La Figura A revela que el ligando se forma a través del moldeamiento de la enzima. La Figura B revela que en presencia de un inhibidor conocido, no se forma el ligando deseado, soportando por lo tanto la aseveración de que la formación del ligando es moldeada por la enzima. Y la Figura C revela que en ausencia de COX-2, no se forma ligando. Este candidato para

formación de imágenes moleculares fue escogido por radiomarcación debido a la facilidad de desplazamiento de grupos para-nitro por fluoruro ^{18}F en andamiajes de piridina.

Esquema de síntesis (continuación) para el precursor:



5 Procedimientos experimentales:

Se preparó la clorometil sulfonamida de acuerdo con los procedimientos de la literatura (ver: Talley, J. J. et al. J. Med. Chem. 2000, 43, 775 - 777).

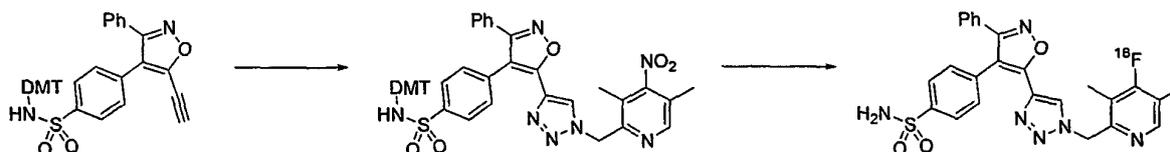
10 Sulfonamida Aldehído: Se añadió trimetil-N-óxido (1,72 g, 22,98 mM, 4 eq.) a la clorosulfonamida (2,00 g, 5,74 mM) en DMSO (10 mL) agitando bajo atmósfera de argón en un matraz de fondo redondo. Se detuvo la reacción con agua después de 1 h cuando no se observó material de partida sobre TLC. Se extrajo luego la mezcla de reacción con acetato de etilo y se lavó la capa orgánica 2 veces con agua, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y concentró hasta sequedad. El producto crudo aislado era un polvo de color blancuzco (~ 1,00 g, rendimiento del 50%) y fue utilizado como tal en la etapa siguiente.

15 Aldehído protegido con DMT: Se añadió trietil amina (0,56 mL, 3,99 mM, 4 eq.) a la sulfonamida aldehído (0,328 g, 0,998 mM) en cloruro de metileno (15 mL) agitando bajo atmósfera de argón seguido por cloruro de DMT (0,44 g, 1,29 mM, 1,3 eq.) y se dejó que reaccionara durante 18 h. Se detuvo luego la mezcla de reacción con agua y se extrajo con cloruro de metileno seguido por lavado de la capa orgánica con salmuera y secado sobre MgSO_4 . Después de filtrar la capa orgánica y concentrarla hasta sequedad, se purificó el producto por cromatografía sobre gel de sílice con una mezcla de acetato de etilo/hexano como eluyente. El producto aislado era un polvo de color amarillo pálido (0,44 g, 70%).

20 Alquino protegido con DMT: A una mezcla de tosil azida (0,304 g, 1,54 mM) y carbonato de potasio (0,32 g, 2,31 mM) agitando en acetonitrilo (20 mL) bajo atmósfera de argón, se le añadió el reactivo fosfonato (0,128 g, 0,77 mM). La reacción se tornó turbia en forma gradual. Después de 2 h, se añadió lentamente el aldehído (0,407 g, 0,65 mM), disuelto en metanol:acetonitrilo (20 mL:20 mL), y la mezcla heterogénea de reacción se tornó en una solución homogénea amarilla con el transcurso del tiempo. Después de 6 h se detuvo la mezcla de reacción con agua y se extrajo con acetato de etilo, se lavó con agua y se secó sobre MgSO_4 . Después de filtración y concentración hasta sequedad, se purificó el producto por medio de cromatografía en columna y se obtuvo el alquino como un compuesto espumoso de color blanco (0,2 g, 50%).

30 Se sintetizó el triazol utilizando el procedimiento general para los triazoles 1,4-disustituidos como se describe en los procedimientos generales para la elaboración de los anti triazoles.

Preparación del agente para formación de imágenes COX-2 marcado con ^{18}F



Síntesis de N-[Bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metil]-4-[5-[1-(3,5-dimetil-4-nitro-piridin-2-ilmetil)-1H-[1,2,3]triazol-4-il]-3-fenil-isoxazol-4-il]-bencenosulfonamida

A un matraz de fondo redondo que contenía al alquino (157 mg, 0,25 mmol) se le añadió tBuOH (10 mL), CuSO₄ (0,04 M, 624 uL), ascorbato de sodio (0,1 M, 500 uL) y la azida (52 mg, 0,25 mmol). Se agitó la solución heterogénea durante la noche a temperatura ambiente. Se vertió la reacción sobre EtOAc y se lavó con NH₄OH diluido y agua. Se secaron las capas orgánicas (MgSO₄), se filtró y concentró hasta sequedad. Se purificó el residuo sobre gel de sílice (empacado utilizando EtOAc:Hex en proporción 1:1) cargando primero con CH₂Cl₂ y luego eluyendo con EtOAc:Hex en proporción 1:1 para producir 115 mg (55%) de un sólido de color blanco.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 2.21 (3H, s), 2.27 (3H, s), 3.64 (6H, s), 5.95 (2H, s), 6.67 - 6.70 (4H, m), 7.09 - 7.52 (18H, m), 8.42 (1H, s), 8.58 (1H, s), 8.65 (1H, s).

LC/MS: Calculado para C₄₆H₃₉N₇O₇S: 833.26; encontrado: 834.2 (M+H)

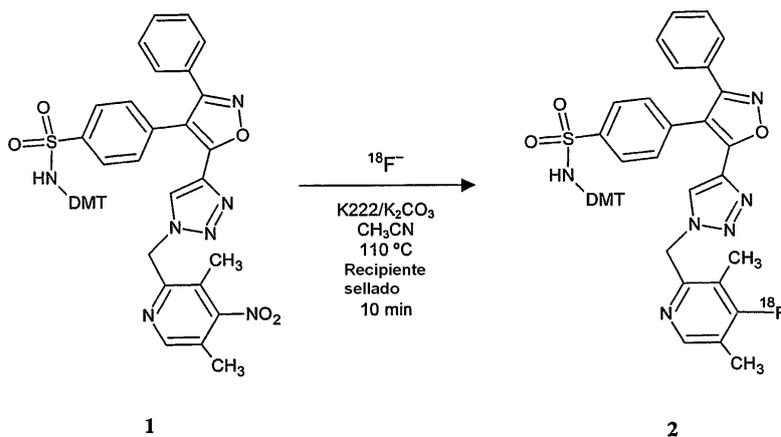
10 2-Azidometil-3,5-dimetil-4-nitro-piridina

A un matraz de fondo redondo que contenía 4-nitro-1-hidroximetil-3,5-dimetilpiridina (0,91 g, 5 mmol) en CH₂Cl₂ (10 mL) se le añadió trietilamina (558 uL, 8 mmol) y anhídrido p-toluenosulfónico (1,96 g, 6 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 2 h. Se vertió la reacción sobre agua y se extrajo en CH₂Cl₂. Se secaron las capas orgánicas (MgSO₄), se filtró y concentró hasta sequedad. Se redisolvió el sólido MeOH (25 mL) y se lo trató con NaN₃ (390 mg, 6 mmol) disuelto previamente en agua (5 mL). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 4 h. Se vertió luego la reacción sobre agua y se extrajo en CH₂Cl₂. Se secaron las capas orgánicas (MgSO₄), se filtró y concentró hasta sequedad. Se purificó el sólido sobre gel de sílice utilizando Et₂O:Hex al 40% como el eluyente para producir 600 mg (58%) de un aceite claro incoloro.

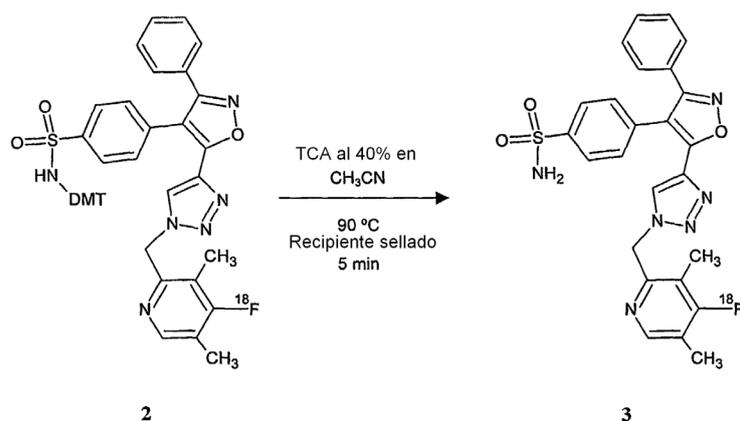
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 2.31 (3H, s), 2.33 (3H, s), 4.51 (2H, s), 8.53 (1H, s)

20 LC/MS: Calculado para C₈H₉N₅O₂: 207.08; encontrado: 180.2 (M+H-N₂), 208.2 (M+H)

Experimento de química clic con COX-2 marcada con F-18



Se irradió agua con oxígeno-18 utilizando protones a 11 MeV (RDS-111 Eclipse, Siemens Molecular Imaging) para generar ion fluoruro [¹⁸F] de la forma usual. Al final del bombardeo, el agua [¹⁸O] que contenía ion fluoruro [¹⁸F] fue transferida desde el objetivo de tantalio hasta un módulo de fluoración nucleofílica automatizado (explora RN, Siemens Biomarker Solutions). Bajo control computarizado, se transfirió la solución de agua [¹⁸O]/ion fluoruro [¹⁸F] a una columna pequeña de resina de intercambio aniónico (Chromafix 45-PS-HCO₃, Machery-Nagel) que había sido previamente lavada con agua (5 mL), bicarbonato de potasio acuoso (0,5 M, 5 mL), y agua (5 mL). Se recuperó el agua [¹⁸O] (1,8 mL) para purificación y reutilización posterior. Se eluyó el ion fluoruro [¹⁸F] atrapado en el recipiente de reacción con una solución de carbonato de potasio (3,0 mg) en agua (0,4 mL). Se añadió una solución de Kryptofix 222 (20 mg) en acetonitrilo (1,0 mL), y se calentó la mezcla (70 a 95°C) al vacío y una corriente de argón para evaporar el acetonitrilo y el agua. Después de enfriar, se añadió al residuo de ion fluoruro [¹⁸F] reactivo "seco", K222, y carbonato de potasio, una solución de 4-{5-[1-(4-nitro-3,5-dimetil-piridin-2-ilmetil)-1H-[1,2,3]triazol-4-il]-3-fenil-isoxazol-4-il}-N-dimetoxitritil-bencenosulfonamida (1, 8,0 mg, 9,6 μmol) en acetonitrilo (800 μL). Se calentó la mezcla de reacción a 110 °C en un recipiente sellado (P_{máx.} = 2,3 bar) durante 10 minutos con agitación (magnética). Se enfrió la mezcla a 55 °C y se evaporó la mayor parte del acetonitrilo al vacío y una corriente de argón como anteriormente.



Al intermediario fluorado [¹⁸F] protegido crudo (**2**) se le añadió una solución de ácido tricloroacético al 40% en acetonitrilo (600 µL), y se calentó la mezcla a 90 °C durante 5 minutos. Después de enfriar a 35 °C, se añadió acetato de sodio acuoso (2,0 M, 550 µL) con agitación. Se transfirió la mezcla de reacción a un bucle para la muestra (1,5 mL), e inyectó sobre una columna de HPLC semipreparativa (Phenomenex Gemini 5µ C18, 250 x 10 mm, fase móvil de 55% de acetonitrilo, 45% de agua, ácido trifluoroacético al 0,01%, 5,0 mL/min). El producto 4-{5-[1-(4-[¹⁸F]fluoro-3,5-dimetilpiridin-2-ilmetil)-1H-[1,2,3]triazol-4-il]-3-fenil-isoxazol-4-il]-bencenosulfonamida (3,5-[1-(4-[¹⁸F]fluoro-3,5-dimetil-piridin-2-ilmetil)1H-[1,2,3]triazol-4-il]-valdecoxib, [¹⁸F]FPVC) eluyó a 8,5 - 9,5 minutos de acuerdo a lo monitoreado por medio de la detección de la radiación que fluyó a través y UV (254 nm). El eluato de la HPLC que contenía el producto (7 - 8 mL) fue recolectado en un vial de 30 mL con una barra de agitación magnética, y se añadió agua (20 mL). Se mezcló completamente la solución acuosa y luego se la pasó a través de una Sep-Pak C18 con la solución de agua/fase móvil yendo hacia una botella de residuos. Se lavó la Sep-Pak C18 con una alícuota adicional de agua (20 mL). Se eluyó luego el producto de la Sep-Pak C18 con etanol (1,0 mL) que fue pasado a través de un filtro estéril 0,22 µm hasta un vial estéril. Se añadió luego agua (9,0 mL) al vial con el producto estéril a través del filtro estéril para producir una concentración de etanol del 10%.

Una corrida típica de producción arrancando con aproximadamente 660 mCi de ion fluoruro [¹⁸F] produjo 69,3 mCi (96,2 mCi con EOB, rendimiento del 14,6 %) de producto aislado después de 52 minutos de síntesis, purificación por HPLC y extracción en fase sólida C18 y reconstitución en etanol al 10%.

Se analizó el producto recolectado por HPLC (Phenomenex Gemini 5µ C18, 150 x 4,6 mm, fase móvil de 55% de acetonitrilo, 45% de agua, ácido trifluoroacético al 0,01%, 1,0 mL/min). Como se monitoreó por medio de la radioactividad y detección con UV (254 nm), este producto tenía un tiempo de retención de 6,1 minutos y una pureza radioquímica del 99,9%.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar una sonda candidata para formación de imágenes, comprendiendo el método:
- 5 a) poner en contacto una primera biblioteca de compuestos candidatos con una biomacromolécula objetivo, cada compuesto de la primera biblioteca de compuestos incluye un primer grupo funcional capaz de participar en una reacción de química clic, y cada compuesto exhibiendo opcionalmente afinidad por un primer sitio de enlazamiento de la biomacromolécula objetivo que incluye un primer sitio de enlazamiento y un segundo sitio de enlazamiento;
- b) la identificación de un primer miembro de la primera biblioteca de compuestos candidatos que exhiben afinidad por el primer sitio de enlazamiento;
- 10 c) poner en contacto al primer miembro identificado a partir de la primera biblioteca de compuestos candidatos que exhiben afinidad por el primer sitio de enlazamiento con la biomacromolécula objetivo;
- d) poner en contacto una segunda biblioteca de compuestos candidatos con el primer miembro y la biomacromolécula objetivo, la segunda biblioteca de compuestos candidatos exhibiendo opcionalmente afinidad por el segundo sitio que enlazamiento, en donde cada compuesto de la segunda biblioteca de compuestos candidatos incluye un segundo grupo funcional complementario capaz de participar en una reacción de química clic con el primer grupo funcional, en donde o bien cada compuesto de la primera biblioteca o cada compuesto de la segunda biblioteca, o cada compuesto tanto de la primera como de la segunda biblioteca de compuestos, incluye independientemente un isótopo no radioactivo de un elemento químico y en donde el elemento químico incluye al menos un radioisótopo, opcionalmente unido a través de un enlazador, en donde el isótopo no radioactivo es F-19, y en donde el isótopo radioactivo es F-18;
- 15 e) la reacción del segundo grupo funcional complementario con el primer grupo funcional a través de una reacción de química clic inducida por una biomacromolécula para formar la sonda candidata para formación de imágenes;
- 20 f) el aislamiento e identificación de la sonda candidata para formación de imágenes;
- g) la preparación de la sonda candidata para formación de imágenes por medio de síntesis química; y
- 25 h) la conversión de la sonda candidata para formación de imágenes en una sonda para formación de imágenes por medio de la conversión del isótopo no radioactivo del elemento en el isótopo radioactivo F-18.
2. El método de la Reivindicación 1, en donde la biomacromolécula es seleccionada del grupo que consiste de enzimas, receptores, ADN, ARN, canales de iones y anticuerpos.
3. El método de la Reivindicación 1, en donde la biomacromolécula objetivo es una proteína que es sobreexpresada en estados de enfermedad, incluyendo beta-amiloide en tejido cerebral de pacientes con enfermedad de Alzheimer.
- 30 4. El método de la Reivindicación 1, en donde el segundo sitio de enlazamiento constituye una porción del primer sitio de enlazamiento.
5. El método de la Reivindicación 1, en donde cada compuesto de la primera biblioteca o cada compuesto de la segunda biblioteca, o cada compuesto tanto de la primera como de la segunda biblioteca de compuestos incluyen un fluoróforo.
- 35 6. El método de la Reivindicación 1, en donde la reacción de química clic es una reacción de cicloadición.
7. El método de la Reivindicación 6, en donde la reacción de cicloadición se selecciona de entre el grupo que consiste de una reacción de Diels-Alder o una reacción de cicloadición 1,3-dipolar.
8. El método de la Reivindicación 7, en donde la reacción de cicloadición es una reacción de cicloadición 1,3-dipolar.
- 40 9. El método de la Reivindicación 1, en donde los grupos funcionales complementarios en clic incluyen una azida y un alquino y en donde la reacción clic forma un producto que contiene 1,2,3-triazol.
10. El método de la Reivindicación 1, en donde el primer grupo funcional es una azida y el segundo grupo funcional es un alquino, o en donde el primer grupo funcional es un alquino y el segundo grupo funcional es una azida.
11. El método de la Reivindicación 10, en donde el alquino es un alquino terminal.
- 45 12. El método de la Reivindicación 1, en donde las etapas de a) hasta f) se llevan a cabo en un procedimiento iterativo de preparación de una nueva primera biblioteca de compuestos y/o una segunda biblioteca de compuestos y se selecciona nuevamente hasta que se identifica una sonda candidata para formación de imágenes con enlazamiento optimizado, biodistribución, metabolismo y propiedades farmacocinéticas.

13. El método de la Reivindicación 12, en donde la sonda candidata identificada para formación de imágenes está marcada con el isótopo radioactivo, y la sonda radioactiva resultante para formación de imágenes es utilizada para un método de formación de imágenes seleccionado de entre el grupo que consiste de PET, SPECT y formación óptica de imágenes.
- 5 14. El método de la Reivindicación 1, en donde la biomacromolécula objetivo es una enzima.
15. El método de la Reivindicación 14, en donde la enzima objetivo es seleccionada de entre el grupo que consiste de las sobreexpresadas o sobreactivadas en estados de enfermedad tales como COX-2, AKT, P13K, o CA-9/CA-12.
- 10 16. El método de la Reivindicación 14, en donde el primer grupo funcional es una azida y el segundo grupo funcional es un alquino terminal, o en donde el primer grupo funcional es un alquino terminal y el segundo grupo funcional es una azida.
17. El método de la Reivindicación 14, en donde los grupos funcionales complementarios de clic incluyen una azida y un alquino y la reacción clic forma un producto que contiene 1,2,3-triazol.
18. El método de la Reivindicación 14, en donde el primer grupo funcional es una azida y el segundo grupo funcional es un alquino, o en donde el primer grupo funcional es un alquino y el segundo grupo funcional es una azida.
- 15 19. El método de la Reivindicación 14, en donde las etapas de a) hasta f) se llevan a cabo en un procedimiento iterativo de preparación de una nueva primera biblioteca de compuestos y/o una segunda biblioteca de compuestos y se selecciona nuevamente hasta que se identifica una sonda candidata para formación de imágenes con enlazamiento optimizado, biodistribución, metabolismo y propiedades farmacocinéticas.
- 20 20. El método de la Reivindicación 14, en donde el compuesto ligando identificado está marcado con el isótopo radioactivo, y el compuesto ligando resultante es utilizado para un método de formación de imágenes seleccionado de entre el grupo que consiste de PET, SPECT y formación óptica de imágenes.
21. El método de la Reivindicación 14, en donde el enlazamiento de los compuestos candidatos dentro de los sitios de enlazamiento de la enzima facilita la reacción de química clic en ausencia de cualquier catalizador añadido externamente.
- 25 22. El método de la Reivindicación 14, en donde la primera biblioteca de compuestos candidatos y/o la segunda biblioteca de compuestos candidatos incluyen además un enlazador entre el compuesto y el primer grupo funcional y/o un enlazador entre el compuesto y el segundo grupo funcional.
- 30 23. El método de la Reivindicación 22, en donde el enlazador incluye entre 1 a 10 átomos en la cadena del enlazador entre el compuesto y el grupo funcional.

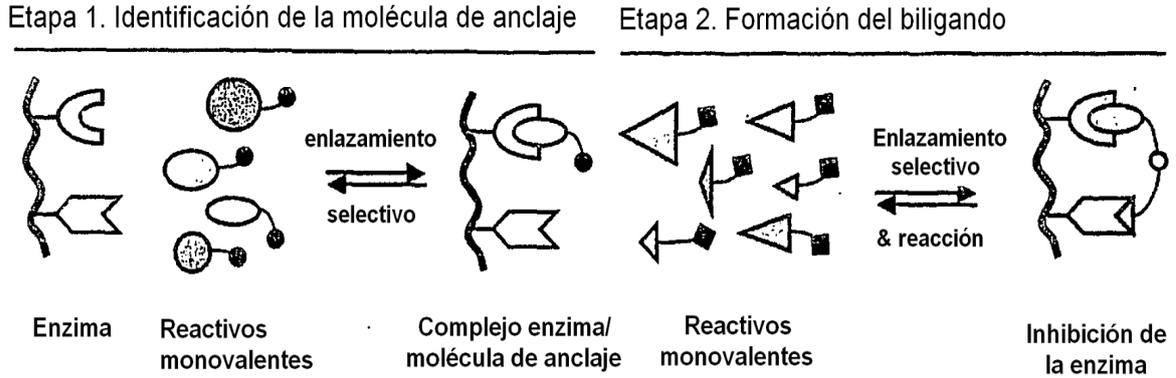


FIG. 1

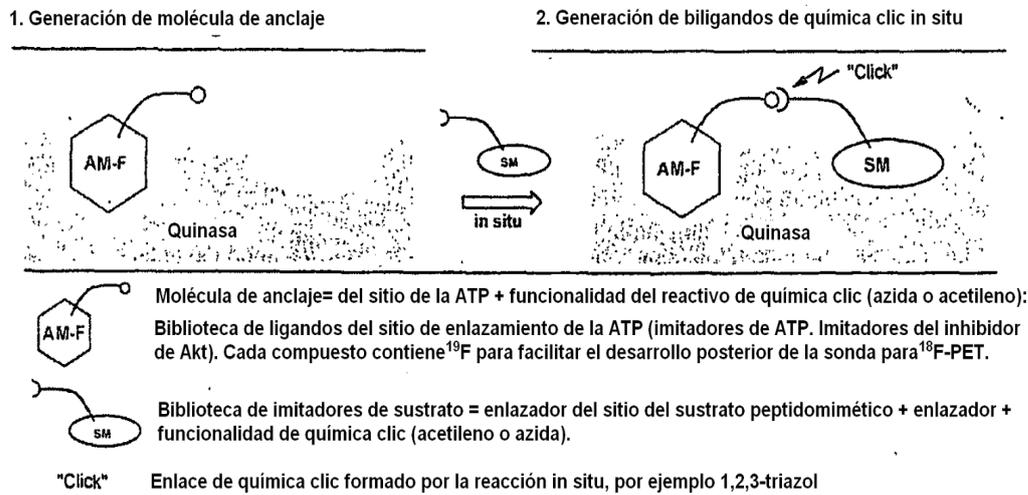


FIG. 2

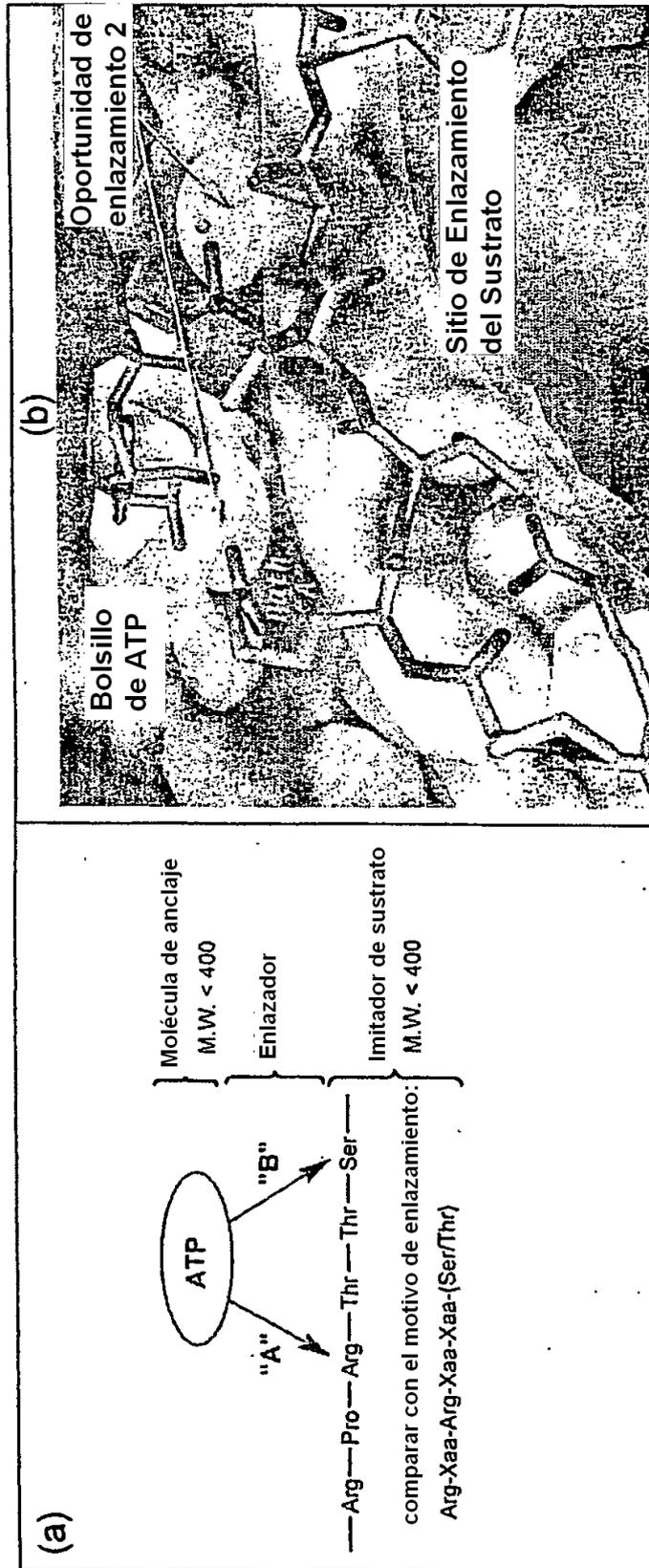


FIG. 3