(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 547 712**

(51) Int. Cl.:

A61K 51/08 (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)
C07K 1/13 (2006.01)
C07D 403/12 (2006.01)
C07D 249/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2010** **E 10706448 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015** **EP 2400992**

(54) Título: **Métodos y composiciones para el marcado de proteínas**

(30) Prioridad:

27.02.2009 US 156165 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.10.2015

(73) Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, US

(72) Inventor/es:

GILL, HERMAN;
MARIK, JAN;
TINIANOW, JEFF y
WILLIAMS, SIMON

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 547 712 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

Métodos y composiciones para el marcado de proteínas

Campo de la invención

La invención se refiere generalmente a métodos para conjugar o marcar grupos a proteínas. La invención también se refiere a proteínas marcadas, y a productos intermedios y reactivos útiles para preparar proteínas marcadas para investigación y desarrollo clínico de novedosas pruebas terapéuticas y de diagnóstico.

Antecedentes de la invención

Las proteínas y péptidos constituyen una gran parte del armamento disponible para la obtención de imágenes moleculares de biomarcadores de la superficie celular. Las proteínas elegidas como diana producidas por ingeniería genética son muy atractivas como agentes de obtención de imágenes por TEP, pero el marcado con grupos prostéticos basados en ^{18}F convencionales es problemático debido a los largos tiempos de síntesis, malos rendimientos radioquímicos y baja actividad específica. Aunque el desarrollo de agentes de obtención de imágenes "ideales" es un objetivo importante, en la práctica se desarrollan muchos agentes de obtención de imágenes a partir de proteínas existentes, tales como anticuerpos monoclonales (mAb) y sus fragmentos manipulados, que se desarrollan inicialmente como posibles agentes terapéuticos o para explorar una biología diana. Los agentes de obtención de imágenes por TEP pueden funcionar en ensayos de diagnóstico o pruebas de biomarcadores, para permitir la selección de pacientes, informar de decisiones sobre la elección de la indicación para candidatos terapéuticos y maximizar el beneficio clínico de un agente terapéutico que dirige el mismo receptor o vía de enfermedad vía. Se realizan pruebas de biomarcadores predictivas antes del tratamiento para predecir si es probable que un tratamiento particular sea beneficioso. Los biomarcadores de pronóstico se correlacionan con el desenlace de la enfermedad y pueden mejorar el diseño del ensayo clínico y el tratamiento, y los niveles de confianza de interpretación de datos.

El desarrollo de agentes de obtención de imágenes para tomografía por emisión de protones (TEP) a partir de un molde de mAb (Immuno-PET) es muy prometedor como herramienta para localizar y cuantificar dianas moleculares y puede potenciar el diagnóstico clínico no invasivo de afecciones patológicas (van Dongen et al (2007) Oncologist 12;1379-89; Williams et a (2001) Cancer Biother Radiopharm 16:25-35; Holliger et al (2005) Nat Biotechnol 23:1126-36). La TEP es una tecnología de obtención de imágenes moleculares que cada vez se usa más para la detección de enfermedad. Los sistemas de obtención de imágenes de TEP crean imágenes basándose en la distribución de isótopos emisores de positrones en el tejido de un paciente. Los isótopos normalmente se administran a un paciente mediante inyección de moléculas de sonda que comprenden un isótopo emisor de positrones, tal como F-18, C-11, N-13 o O-15, covalentemente unido a una molécula que es fácilmente metabolizada o se localiza en el cuerpo (por ejemplo, glucosa) o que se une químicamente a sitios receptores dentro del cuerpo. En algunos casos, el isótopo se administra al paciente como una solución iónica o por inhalación. Agentes de obtención de imágenes de Immuno-PET pequeños, tales como fragmentos de anticuerpos Fab (50 kDa) o diacuerpos, dímeros emparejados de la región V_H-V_L covalentemente asociada del mAb, 55 kDa (Shively et al (2007) J Nucl Med 48:170-2), pueden ser particularmente útiles ya que presentan una semivida en la circulación corta, alta permeabilidad de tejidos y alcanzan una relación óptima de tumor con respecto a fondo entre dos a cuatro horas después de la inyección, facilitando el uso de isótopos de semivida corta tales como el ^{18}F ampliamente disponible (109,8 min).

Las proteínas elegidas como diana producidas por ingeniería genética son muy atractivas como agentes de obtención de imágenes de TEP, pero el marcado con grupos protésicos basados en ^{18}F convencionales es problemático debido a largos tiempos de síntesis, malos rendimientos radioquímicos y baja actividad específica, una plataforma modular para la rápida preparación de diversos grupos protésicos solubles en agua capaz de introducir eficazmente ^{18}F en proteínas. La combinación de la sensibilidad y alta resolución ofrecida por la obtención de imágenes de TEP basada en ^{18}F con la alta especificidad de estos fragmentos de anticuerpos es una estrategia particularmente atractiva para la investigación y el desarrollo clínico de novedosos ensayos de diagnóstico y terapéuticos. La producción de proteínas marcadas con ^{18}F por los actuales métodos es inadecuada debido a que son necesarias condiciones de reacción acuosas relativamente suaves para preservar la función de la mayoría de las proteínas. Los grupos prostéticos marcados con ^{18}F existentes usados para las conjugaciones de proteína están frecuentemente limitados por alguna combinación de mal rendimiento radioquímico, largo tiempo de síntesis y baja actividad específica. Los métodos mejorados para generar proteínas marcadas con ^{18}F son valiosos en facilitar la obtención de imágenes moleculares en seres humanos para tratar procesos de desarrollo clínico tales como el nivel de expresión diana, heterogeneidad y transcurso de la expresión.

Se prefiere la conjugación específica de sitio con respecto a la modificación del amino aleatoria ya que permite la modificación química de un sitio lejos del sitio de unión, promoviendo la completa retención de la actividad biológica y permitiendo el control con respecto al posible número de grupos prostéticos añadidos. Se han investigado las proteínas genéticamente manipuladas que contienen cisteína en posiciones seleccionadas para desarrollar conjugaciones específicas de sitio (Junutula, J.R. et al (2008) J Immunol Methods 332:41-52; documento US 2007/0092940). El marcado de radionúclidos de grupos tiol sobre residuos de cisteína manipulados por grupos

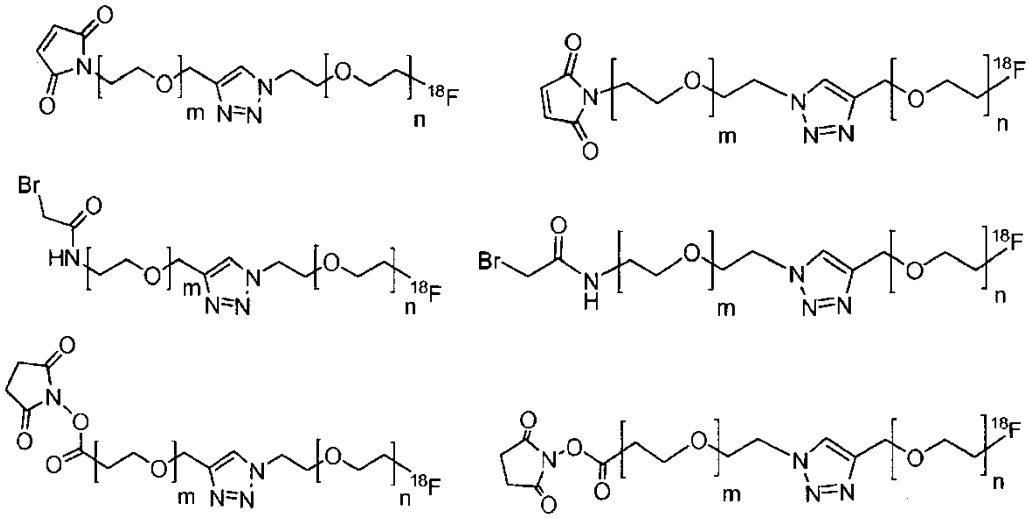
prostéticos es ventajoso como método específico de sitio ya que la presencia de cisteína está limitada dentro del proteoma, del cual la forma de disulfuro no reactiva es la dominante (Olafsen et al (2004) Protein Eng Des Sel 17:21-7; Tait et al (2006) J Nucl Med 47:1546-53; Li et al (2008) Bioconjug Chem 19:1684-8). Un método de manipulación de proteínas, PHESELECTOR, emplea biblioteca de expresión en fago para seleccionar la posición de aminoácido óptima para la sustitución de cisteína (Junutula et al. (2008) Nat Biotechnol 26:925-32; Junutula et al (2008) J Immunol Methods 332:41-52; documento US 2007/0092940). Usando el método PHESELECTOR se retiene la estabilidad y afinidad de unión de proteínas, mientras que se minimiza la formación de enlaces disulfuro no deseados, proporcionando eficiencias de conjugación óptimas. Este método se usa para producir mAb modificado que contiene una cisteína disponible (TiomAb), a partir del cual se genera convenientemente un fragmento Fab (TioFab) con un grupo tiol reactivo.

Se han usado grupos prostéticos que contienen el grupo maleimida, tales como [^{18}F]FBEM (Cai et al (2006) J Nucl Med 47:1172-80), [^{18}F]FBAM (Berndt et al (2007) Nucl Med Biol 34:5-15), [^{18}F]FBABM (Li et al (2008) Bioconjug Chem 19:1684-8; Toyokuni et al (2003) Bioconjug Chem 14:1253-9), [^{18}F]FBOM (Wuest et al (2009) Amino Acids 36:283-295), [^{18}F]FDG-MHO (Wuest et al (2008) Bioconjug Chem 19:1202-10) y [^{18}F]FPyMe (de Bruin et al (2005) Bioconjug Chem 16:406-20) para introducir de forma específicamente de sitio ^{18}F en una proteína que lleva tiol. Estos reactivos de marcado [^{18}F]FBEM, [^{18}F]FBAM, [^{18}F]FBABM y [^{18}F]FBOM se desarrollaron a partir de una plataforma común en la que el precursor aromático, ^{18}F-fluorobenzaldehído ([^{18}F]FBALD), se acopla a un precursor de maleimida que lleva aminooxi. Sin embargo, la presencia de restos aromáticos y alifáticos (con la excepción de [^{18}F]FBOM) potencia la lipofilia de estos grupos prostéticos, limitando posiblemente la eficiencia de conjugación con grupos de tiol de la proteína presentes dentro de un entorno hidrófilo. Además, estos grupos prostéticos requieren largos tiempos de síntesis y normalmente proporcionan rendimientos radioquímicos relativamente malos de proteína marcada con ^{18}F. El documento US 2008/0161537 describe un método en el que se usan grupos maleimida para unir un grupo azida o alquino a una proteína que lleva tiol, seguido de marcado usando alquino/azida marcada con ^{18}F

Sumario

Se proporciona una plataforma modular para la rápida preparación de diversos grupos prostéticos solubles en agua capaces de introducir eficazmente ^{18}F en proteínas.

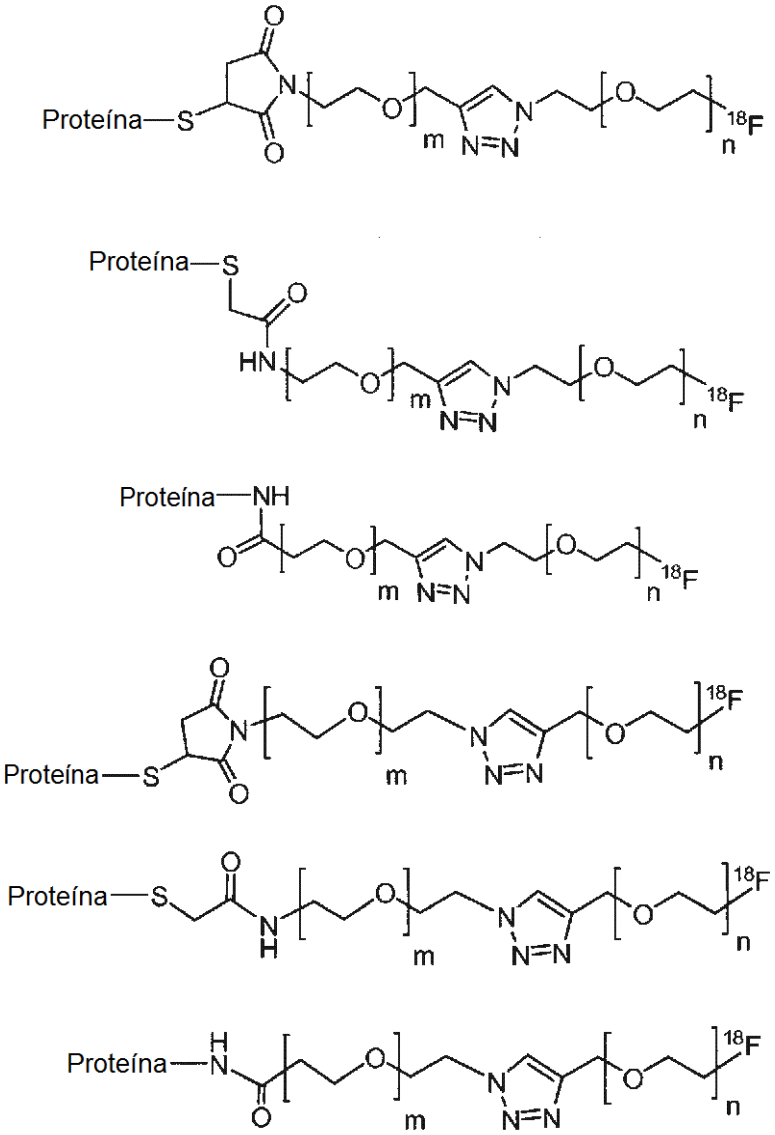
Un aspecto de la invención incluye métodos de marcado de una proteína que comprenden hacer reaccionar un reactivo de marcado y una proteína para formar una proteína marcada. Los reactivos de marcado incluyen:



en las que n y m están seleccionados independientemente de un número entero de 2 a 12.

Un aspecto de la invención incluye procesos para preparar un reactivo de marcado.

Un aspecto de la invención incluye proteínas marcadas seleccionadas de:



Un aspecto de la invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína marcada y uno o más vehículos, deslizantes, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Un aspecto de la invención incluye un método de obtención de imágenes que comprende:

administrar la proteína marcada a un animal; y
detectar *in vivo* la presencia de la proteína marcada por obtención de imágenes

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una ruta de síntesis a modo de ejemplo para radiomarcar fragmentos Fab usando [^{18}F]FPEGMA. PEG = 2-12 unidades de etiloxi
La Figura 2 muestra una ruta de síntesis a modo de ejemplo para radiomarcar fragmentos Fab usando [^{18}F]FPEGMA.
La Figura 3 muestra la síntesis de los productos intermedios **2** y **4**. Reactivos: i. NaH, bromuro de propargilo; ii. maleimida, PPh_3, DIAD; iii. TsCl, piridina; iv. $TBAHCO_3$, [^{18}F]fluoruro
La Figura **4** muestra la síntesis de [^{18}F]FPEGMA **5** y el radiomarcado de un TioFab para dar [^{18}F]FPEGMA-Tio4D5Fab **6**. Reactivos: v. $CuSO_4.H_2O$, BPDS, ascorbato de sodio; vi. tampón fosfato a pH 8
La Figura 5 muestra (a) Imágenes de microTEP representativas (rebanadas coronales a través del tumor) del animal antes (día -1) y después (día 1) de la terapia con 17-AAG (arriba) en comparación con animal de control (abajo). (b) Captación de ^{18}F-4D5TioFab en el tejido tumoral antes y después de la terapia.

Descripción detallada de las realizaciones a modo de ejemplo

Ahora se hará referencia en detalle a ciertas realizaciones de la invención, ejemplos de las cuales se ilustran en las estructuras y fórmulas adjuntas. La invención se describirá conjuntamente con las realizaciones enumeradas.

A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención, y están de acuerdo con: Singleton et al, (1994) "Dictionary of Microbiology and Molecular Biology", 2nd Ed., J. Wiley & Sons, New York, NY; y Janeway, et al (2001) "Immunobiology", 5th Ed., Garland Publishing, New York. Cuando se usan nombres comerciales en el presente documento, los solicitantes pretenden incluir independientemente la formulación de producto del nombre comercial, el fármaco genérico y el (los) componente(s) farmacéutico(s) activo(s) del producto de nombre comercial.

Definiciones

A menos que se establezca de otro modo, los siguientes términos y frases como se usan en el presente documento pretenden tener los siguientes significados:

Una "proteína" es un compuesto orgánico hecho de aminoácidos dispuestos en una cadena lineal y unidos juntos por enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de residuos de aminoácidos adyacentes. Las proteínas son macromoléculas biológicas e incluyen enzimas y anticuerpos. Muchas proteínas son vitales para el metabolismo, señalización de células, respuestas inmunitarias, adhesión de células, efectos del ciclo celular, o tienen funciones estructurales o mecánicas, tales como en músculo y el citoesqueleto. Clases funcionales de proteínas a modo de ejemplo incluyen un anticuerpo, una proteína de unión alternativa no de anticuerpo (Binz et al (2005) Nature Biotechnology 23(10):1257-1268; Skerra, A. (2007) Current Opin. in Biotech. 18:295-304), un interferón, una linfocina, una citocina, una hormona o un factor de crecimiento

"Anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y específicamente cubre anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), Fab de acción dual y otros fragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos, o derivarse de otras especies. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmunitario que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico (Janeway, et al (2001) "Immunobiology", 5th Ed., Garland Publishing, New York). Un antígeno diana generalmente tiene numerosos sitios de unión, también llamados epítopes, reconocidos por CDR sobre múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítope diferente tiene una estructura diferente. Así, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente. El anticuerpo también se refiere a una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de una diana de interés o parte de la misma, incluyendo tales dianas, pero no se limitan a, célula o células cancerosas que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados a una enfermedad autoinmunitaria. Los polipéptidos del antígeno de superficie de la célula asociados a tumor, es decir, antígenos asociados a tumor (TAA), permiten el direccionamiento específico de células cancerosas para su destrucción mediante terapias basadas en anticuerpo. La inmunoglobulina desvelada en el presente documento puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD y IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA y IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden derivarse de cualquier especie. En un aspecto, sin embargo, la inmunoglobulina es de origen humano, murino o de conejo.

Anticuerpos monoclonales terapéuticos útiles para los métodos de la invención incluyen trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., Carter et al (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285-4289; documento US 5.725.856); anticuerpos anti-CD20 tales como anti-CD20 quimérico "C2B8" (documento US 5736137); rituximab (RITUXAN®), ocrelizumab, una variante quimérica o humanizada del anticuerpo 2H7 (documentos US 5721108; WO 04/056312) o tositumomab (BEXXAR®); anti-IL-8 (St John et al (1993) Chest, 103:932, y documento WO 95/23865); anticuerpos anti-VEGF que incluyen anticuerpos anti-VEGF humanizados y/o madurados por afinidad tales como el anticuerpo anti-VEGF humanizado huA4.6.1 bevacizumab (AVASTIN®, Genentech, Inc., Kim et al (1992) Growth Factors 7:53-64, documentos WO 96/30046, WO 98/45331); anticuerpos anti-PSCA (documento WO 01/40309); anticuerpos anti-CD40, que incluyen S2C6 y variantes humanizadas de los mismos (documento WO 00/75348); anti-CD11a (documentos US 5622700; WO 98/23761; Steppe et al (1991) Transplant Intl. 4:3-7; Horamant et al (1994) Transplantation 58:377-380); anti-IgE (Presta et al (1993) J. Immunol. 151:2623-2632; documento WO 95/19181); anti-CD18 (documentos US 5622700; WO 97/26912); anti-IgE, que incluye E25, E26 y E27 (documentos US 5714338; US 5091313; WO 93/04173; US 5714,338); anticuerpo anti-receptor de Apo-2 (documento WO 98/51793); anticuerpos anti-TNF-alfa que incluyen cA2 (REMICADE®), CDP571 y MAK-195 (documento US 5672347; Lorenz et al (1996) J. Immunol. 156(4):1646-1653; Dhainaut et al (1995) Crit. Care Med. 23(9):1461-1469); anti-factor tisular (TF) (documento EP 0 420 937 B1); anti-integrina alfa 4 beta 7 humana (documento WO 98/06248); anticuerpo anti-EGFR, quimerizado o humanizado, 225 (documento WO 96/40210); anticuerpos anti-CD3 tales como OKT3 (documento US 4515893); anticuerpos anti-CD25 o anti-tac tales como CHI-621 SIMULECT® y ZENAPAX® (documento US 5693762); anticuerpos anti-CD4 tales como el anticuerpo cM-7412 (Choy et al (1996) Arthritis Rheum 39(1):52-56); anticuerpos anti-CD52 tales como CAMPATH-1H (Riechmann et al (1988) Nature 332:323-

337); anticuerpos anti-receptor de Fc tales como el anticuerpo M22 dirigido contra Fc gamma RI como en Graziano et al (1995) J. Immunol. 155(10):4996-5002; anticuerpos anti-antígeno carcinoembrionario (CEA) tales como hMN-14 (Sharkey et al (1995) Cancer Res. 55(23Suppl): 5935s-5945s; anticuerpos dirigidos contra células epiteliales de mama que incluyen huBrE-3, hu-Mc 3 y CHL6 (Ceriani et al (1995) Cancer Res. 55(23):5852s-5856s; y Richman et al (1995) Cancer Res. 55(23 Supp): 5916s-5920s); anticuerpos que se unen a células de carcinoma de colon tales como C242 (Litton et al (1996) Eur J. Immunol. 26(1):1-9); anticuerpos anti-CD38, por ejemplo A 13/5 (Ellis et al (1995) J. Immunol. 155(2):925-937); anticuerpos anti-CD33 tales como Hu M 195 (Jurcic et al (1995) Cancer Res 55(23 Suppl):5908s-5910s y CMA-676 o CDP771; anticuerpos anti-CD22 tales como LL2 o LinfoCide (Juweid et al (1995) Cancer Res 55(23 Suppl):5899s-5907s); anticuerpos anti-EpCAM tales como 17-1A (PANOREX®); anticuerpos anti-GpIIb/IIIa tales como abciximab o c7E3 Fab (REOPRO®); anticuerpos anti-RSV tales como MEDI-493 (SYNAGIS®); anticuerpos anti-CMV tales como PROTOVIR®; anticuerpos anti-VIH tales como PRO542; anticuerpos anti-hepatitis tales como el anticuerpo anti-Hep B OSTAVIR®; anticuerpo anti-CA 125 OvaRex; anticuerpo anti-epítope de GD3 idiotípico BEC2; anticuerpo anti-alfa v beta3 VITAXIN®; anticuerpo anti-carcinoma de células renales humano tal como ch-G250; ING-1; anticuerpo anti-17-1A humano (3622W94); anticuerpo anti-tumor colorrectal humano (A33); anticuerpo anti-melanoma humano R24 dirigido contra el gangliósido GD3; anticuerpos anti-carcinoma de células escamosas humano (SF-25); y anti-antígeno leucocitario humano (HLA) tal como Smart ID10 y el anticuerpo anti-HLA DR Oncolym (Lym-1).

Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión al antígeno o variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id), CDR (región determinante de la complementariedad), ECD (dominio extracelular) y fragmentos de unión a epítope de cualquiera de los anteriores que se unen inmunoespecíficamente a antígenos de células cancerosas, antígenos virales o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab mediante la adición de algunos residuos en el extremo carboxi del dominio de la cadena pesada CH1 que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab', en el que el (los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes poseen al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')2 se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

“Anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminar por otros anticuerpos. El adjetivo “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo por obtenerse a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiera la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención pueden prepararse por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al (1975) Nature 256:495, o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (véase el documento US 4816567). Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpo de fago usando las técnicas descritas, por ejemplo, en Clackson et al (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597.

“Anticuerpos manipulados con cisteína” son anticuerpos manipulados a partir de los anticuerpos no mutantes u parentales por la introducción de uno o más aminoácidos de cisteína libres. Un “aminoácido de cisteína libre” es un residuo de aminoácido de cisteína que se ha manipulado en un anticuerpo parental, tiene un grupo funcional tiol (-SH) y no está emparejado como, o de otro modo es parte de, un puente de disulfuro intramolecular o intermolecular. El aminoácido de cisteína libre puede estar en la cadena pesada, cadena ligera o región Fc de un anticuerpo. Un residuo de cisteína manipulado (“tiol de cisteína libre”) es reactivo con reactivos de marcado reactivos con tiol. Los anticuerpos manipulados con cisteína incluyen fragmentos de anticuerpos Fab (tioFab) y anticuerpos monoclonales IgG de longitud completa expresados (TiomAb) (documentos US 2007/0092940; WO 2008/141044). Los anticuerpos TioFab y TiomAb se han conjugado mediantes conectores en los tioles de cisteína recientemente introducidos con reactivos conectores reactivos con tiol y reactivos conectores de fármaco para preparar conjugados de anticuerpo-fármaco.

“PEG” se refiere a un fragmento de poli(etilenglicol), un polímero de óxido de etileno, e incluye 2 o más unidades de etilenoxi ($-CH_2CH_2O-$).

Síntesis de reactivos de marcado

La invención incluye una plataforma modular para la rápida preparación de diversos grupos prostéticos solubles en agua capaces de introducir eficazmente ^{18}F en proteínas (Gill et al (2009) Jour. Med. Chem. 52(19):5816-5825). La utilidad de esta plataforma se demuestra por el grupo prostético específico de tiol y reactivo de marcado, [^{18}F] FPEGMA **5**, que se produjo rápidamente en una síntesis de dos etapas en un recipiente (Figura 1). Adicionalmente, para promover la solubilidad en agua y la eficiencia de conjugación resultante de [^{18}F]FPEGMA con proteína en condiciones acuosas, se usaron "elementos estructurales" basados en polietilenglicol (PEG). [^{18}F]FPEGMA **5** se evaluó como grupo prostético con 4D5TioFab y el conjugado resultante (^{18}F-4D5TioFab) se validó *in vivo* como agente de obtención de imágenes del nivel de expresión de HER2 en un modelo murino de xenoinjerto de tumor humano modulado por un inhibidor Hsp90 (Smith-Jones et al (2006) J Nucl Med 47:793-6; Smith-Jones et al (2004) Nat Biotechnol 22:701-6).

La utilidad de [^{18}F]FPEGMA 5 de la realización a modo de ejemplo demuestra varios grupos prostéticos marcados con ^{18}F y reactivos de marcado que pueden contemplarse (Figura 3), que incluyen el compuesto de bromoacetamida específico de tiol [^{18}F]FPEGBA, el compuesto de N-hidroxisuccinimida (NHS) específico de amino [^{18}F]FPEGNHS, el compuesto específico de azida [^{18}F]FPEG-propargilo y el compuesto específico de alquino [^{18}F]FPEGN_3. Puede utilizarse otra funcionalidad específica de tiol en grupos prostéticos marcados con ^{18}F y reactivos de marcado tales como vinilsulfonas como aceptores de Michael, cloro- y yodoacetamidas como reactivos alquilantes de azufre adicionales. Grupos funcionales específicos de amino para el marcado de la lisina y otros grupos amino de proteínas incluyen diversos ésteres de ácidos carboxílicos activados tales como éster tetrafluorofenílico, éster pentafluorofenílico, N-hidroxisuccinimida y sulfohidroxisuccinimida.

Un procedimiento de síntesis útil es la cicloadición de azida-alquino catalizada por cobre (I) (CuAAC) para preparar reactivos de marcado a partir de productos intermedios de éster y alquino por cicloadición 1,3-dipolar, algunas veces denominada "química de Click". Las rápidas velocidades de reacción y ortogonalidad de la reacción de CuAAC con respecto a la mayoría de los grupos funcionales, que incluyen aquellos encontrados sobre biomoléculas tales como proteínas, promueve la estabilidad y el alto rendimiento que forma el grupo 1,2,3-triazolilo del producto. Así, CuAAC proporciona un método robusto de acoplamiento de precursores heterobifuncionales que contienen grupos funcionales azida y alquino.

La química de Click proporciona una oportunidad de diseñar reactivos de marcado para conjugar con proteínas como trazadores de obtención de imágenes de TEP, que muestran afinidades extremadamente altas por sus dianas biológicas. La química de Click es un enfoque modular para la síntesis química, ejemplificada en las Figuras 1, 2 y 4. Las técnicas de química de Click se describen, por ejemplo, en las siguientes referencias: Kolb et al (2001) Angew. Chem. Int. Ed. 40:2004-2021; Kolb et al (2003) Drug Discovery Today 8:1128-1137; Rostovtsev et al (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599; Tornoe et al (2002) Jour. of Org. Chem. 67:3057-3064; Wang et al (2003) Jour. of the Am. Chem. Soc. 125:3192-3193; Lee et al (2003) Jour. of the Am. Chem. Soc. 125:9588-9589; Lewis et al (2002) Angew. Chem., Int. Ed. 41:1053-1057; Manetsch et al (2004) Jour. of the Am. Chem. Soc. 126:12809-12818; Mocharia et al (2005) Angew. Chem. Int. Ed. 44:116-120; Whiting et al (2006) Angew. Chem. 118:1463-1467; Whiting et al (2006) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 45:1435-1439.

Un ejemplo es el grupo prostético que lleva maleimida, [^{18}F]FPEGMA **5**, que se produjo rápidamente en una síntesis de dos etapas en un solo recipiente (Figura 1) con el catalizador de cobre $Cu(MeCN)_4PF_6$ (Ejemplo 5). Puede emplearse otros varios catalizadores de cobre para formar el triazol, que incluyen $CuSO_4$, CuI, CuBr, CuOTf (documento US 7375234). El catalizador de cobre puede ser un hidrato o una forma solvatada. El reactivo de cobre usado puede ser una especie de Cu^0 tal como alambre de cobre, una sal de Cu^I o una sal de Cu^{II} en presencia de un agente reductor tal como ascorbato de sodio. Un producto intermedio bifuncional de azida-tosilato N_3-PEG-OTs, en el que PEG es una unidad de polietilenoxi de 2 a 12 grupos etilenoxi ($-CH_2CH_2O-$), tal como p-toluenosulfonato de 23-azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosan-1-ilo **3** (Ejemplo 3) se fluora con el anión ^{18}F para generar el producto intermedio radioquímico N_3-PEG-^{18}F, ejemplificado por 23-azido-1-fluoro-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosano **4** (Ejemplo 4). Adicionalmente, para promover la solubilidad en agua y la eficiencia de conjugación resultante de [^{18}F]FPEGMA **5** con proteína en condiciones acuosas, se usaron "elementos estructurales" basados en polietilenglicol (PEG). [^{18}F]FPEGMA **5** se evaluó como grupo prostético con 4D5TioFab y el conjugado resultante (^{18}F-4D5TioFab **6**) se validó *in vivo* como agente de obtención de imágenes del nivel de expresión de HER2 en un modelo murino de xenoinjerto de tumor humano modulado por un inhibidor de Hsp90 (Smith-Jones et al (2006) J Nucl Med 47:793-6; Smith-Jones et al (2004) Nat Biotechnol 22:701-6).

Consideraciones para la síntesis de [^{18}F]FPEGMA incluyen el uso de elementos estructurales solubles en agua con cadenas de PEG, la implementación de calentamiento acelerado por microondas, el acoplamiento de reactantes mediante el sistema de CuAAC y la optimización de la reacción específica de sitio de [^{18}F]FPEGMA**5** a proteínas tales como 4D5TioFab con posterior validación biológica. Los grupos prostéticos hidrófilos pueden proporcionar cinética de conjugación superior y eficiencia con 4D5TioFab y otras proteínas hidrófilas. Por tanto, se investigaron elementos estructurales con cadenas de PEG, ya que mejoran la solubilidad en agua sin comprometer la solubilidad en disolventes orgánicos requerida para la incorporación nucleófila de ^{18}F. Los grupos prostéticos de la invención son más solubles en agua que los compuestos derivados de la plataforma de [^{18}F]FBALD. Por ejemplo, el logP

medido de [^{18}F] **5** (-2,41 ± 0,09) es tres unidades del valor informado para [^{18}F]FBOM y por encima de cinco unidades de [^{18}F]FBAM (Wuest et al (2009) Amino acids 36:283-295). La ventaja de los grupos prostéticos solubles en agua en la conjugación con 4D5TioFab, y quizás las proteínas hidrófilas en general, se validó por la observación de que [^{18}F] **5** proporcionó una eficiencia de conjugación superior en comparación con [^{18}F]FBAM bajo condiciones comparables.

El calentamiento con microondas mejoró el rendimiento de [^{18}F] **4** y redujo el tiempo de síntesis total de [^{18}F] **5** en comparación con condiciones de calentamiento convencionales. Se observó una aceleración significativa del calentamiento del disolvente durante la fluoración con ^{18}F de **3**, la eliminación azeotrópica de agua del eluyente TBAHCO, o K222/K_2CO_3, y la evaporación de acetonitrilo después del tratamiento con alúmina de [^{18}F] **4** para los métodos A y B. Tales ventajas del calentamiento con microondas para el uso radioquímico general pueden ser generales. Sin embargo, una advertencia importante es que se observó degradación de K222/K_2CO_3 durante la eliminación azeotrópica de agua cuando se usó alta potencia de microondas (superior a 50 W) o temperatura (superior a 100 ºC). Por tanto, se requieren condiciones de calentamiento con microondas suaves para eliminar azeotrópicamente el agua del eluyente de K222/K_2CO_3 que proporciona un tiempo de evaporación comparable y comparable a los rendimientos de fluoración con ^{18}F superiores en comparación con condiciones de calentamiento convencionales.

Se seleccionó el método de CuAAC usado para acoplar reactivos precursores que llevan azida y alquino y producen el reactivo de marcado [^{18}F] **5** basándose en la velocidad de reacción observada, eficiencia de conversión y pureza (Ejemplo 5). La baja pureza de [^{18}F] **5** observada con el método A puede atribuirse a la inestabilidad de los compuestos basados en maleimida en condiciones acuosas durante el tiempo de reacción de 20 minutos. Se usaron dos ligandos bidentados, BPDS y TBTA, que se han establecido como catalizadores para mejorar la velocidad de la reacción de CuAAC y la ortogonalidad con conjugaciones de proteína (Lewis et al (2004) J Am Chem Soc 126:9152-3; Rodionov et al (2007) J Am Chem Soc 129:12705-12; Rodionov et al (2007) J Am Chem Soc 129:12696-704). La espectacular mejora en la pureza observada para [^{18}F] **5** cuando BPDS se añadió al sistema de reacción del método A puede resultar del corto tiempo de reacción del método B, que limita la degradación de [^{18}F] **5** en condiciones acuosas. Esto se refuerza por la observación de que la degradación de [^{18}F] **5** con el tiempo fue generalmente comparable entre los métodos A y B. Para los métodos A y B, $TBAHCO_3$ proporcionó productos de degradación significativamente menos marcados con ^{18}F que K222/K_2CO_3, que se atribuye a la sensibilidad de la maleimida a reactivos básicos en condiciones acuosas. La pureza mejorada de [^{18}F] **5** observada cuando el tratamiento con alúmina se incluyó antes de CuAAC indica además la sensibilidad del producto a la base.

A pesar de la mejora en el tiempo de reacción y la pureza observada en el método B, la reacción de CuAAC realizada en disolvente orgánico promovería la estabilidad de [^{18}F] **5**. Esto provocó la investigación del método C, que se realizó en acetonitrilo anhidro, en el que [^{18}F] **5** fue estable e incluso toleró reactivos básicos, tales como 2,6-lutidina. Sin embargo, para prevenir la posterior degradación de [^{18}F] **5**, la reacción de CuAAC se inactivó con agua que contenía 0,01 % de ácido trifluoroacético. En este ejemplo, proporcionando el método C una pureza significativamente mayor en comparación con el método A y pureza comparable en comparación con el método B. Además, para grupos prostéticos más lábiles acuosos, tales como [^{18}F]FPEGNHS, el método C proporcionó pureza significativamente mayor en comparación con los métodos A y B.

Se obtuvieron rendimientos comparables usando [^{18}F] **4** o [^{18}F]FPEG$_4$N$_3$ con los métodos B y C. La solubilidad en agua limitada observada para [^{18}F]FPEG$_2$N$_3$ se distinguió del método C. Adicionalmente, el método C no requiere el tratamiento con alúmina entre las etapas de fluoración con ^{18}F y de reacción de CuAAC. Por tanto, el método C puede ser muy apto para la aplicación radioquímica general que facilita el desarrollo de un proceso radioquímico coherente para la producción de varios grupos prostéticos marcados con ^{18}F. Esto puede tener fuertes implicaciones para la automatización y puede eliminar la necesidad de dedicar un módulo de síntesis a un grupo prostético específico, como es el caso con [^{18}F]SFB.

El método B se empleó principalmente para la producción de [^{18}F] **5**, ya que el perfeccionamiento del método C se produjo después de la optimización de [^{18}F]**5** y la validación en 4D5TioFab. Sin embargo, se ha confirmado que el método C proporciona [^{18}F] **5** y ^{18}F-4D5TioFab con rendimiento comparable al método B. Así, los métodos B y C son ambos útiles para la preparación de proteínas marcadas con ^{18}F usando [^{18}F] **5** y pueden ser adecuados para aplicación radioquímica más amplia, usando otros radionúclidos.

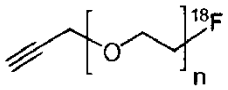
La ortogonalidad de la reacción de CuAAC facilita el desarrollo de varios grupos prostéticos marcados con ^{18}F a partir de una plataforma de reacción común. Modificando propiedades específicas, tales como la quimioselectividad y la estructura de la cadena intermedia, varios grupos prostéticos pueden introducir ^{18}F en proteínas y posiblemente péptidos (Figura 5). Además de [^{18}F] **5**, el grupo prostético específico de amino, [^{18}F]FPEGNHS **13**, de un precursor comercialmente disponible, N$_3$-PEG$_4$-NHS, usando el método C, se conjugó con 4D5TioFab. Además de asegurar la estabilidad y promover el rendimiento de [^{18}F]FPEGNHS, las marcas de la invención pueden limitar la reducción de inmunorreactividad característica de modificaciones específicas de amino aleatorias. Por ejemplo, el impedimento estérico de [^{18}F]FPEGNHS dentro del sitio de unión a proteína puede reducirse usando elementos estructurales con cadenas intermedias más pequeñas. Por tanto, [^{18}F]FPEGNHS es una alternativa a [^{18}F]SFB para realizar conjugaciones específicas de amino. Además, el análogo de bromoacetamida específico de tiol [^{18}F]FPEGBA es útil

para marcar proteínas usando el método B.

Están disponibles varios grupos prostéticos marcados con ^{18}F, que incluye el compuesto de bromoacetamida específico de tiol [^{18}F]FPEGBA, el compuesto de N-hidroxisuccinimida (NHS) específico de amino [^{18}F]FPEGNHS, el compuesto específico de azida [^{18}F]FPEG-propargilo y el compuesto específico de alquino [^{18}F]FPEGN_3.

Protocolos sintéticos detallados y datos analíticos se presentan en los ejemplos. La Figura 3 y los ejemplos explican resumidamente la preparación de productos intermedios de marcado TsO-PEG$_8$-N_3 **3**, TsO-PEG$_4$-N_3 **7** y TsO-PEG$_2$-N_3 **8**, de utilidad general para la producción de grupos prostéticos marcados con ^{18}F, y propargil-PEG$_6$-maleimida **2**, un precursor específico para la síntesis de [^{18}F] **5** ([^{18}F]FPEGMA). El compuesto **3** se sintetizó a partir de HO-PEG$_8$-N_3 heterobifuncional comercialmente disponible y cloruro de tosilo en piridina con un rendimiento del 25 %. Los compuestos **7** y **8** se sintetizaron con un rendimiento del 30 % y 19 %, respectivamente, calentando cantidades equimolares de NaN_3 y el PEG-ditosilato apropiado en DMF a 110 ºC. La síntesis de **2** a partir de hexaetilenglicol requirió dos etapas; se empleó síntesis del éter de Williamson usando cantidades equimolares de NaH y bromuro de propargilo y proporcionado un rendimiento del 54 % de propargil-PEG$_6$-OH **1**, seguido de la reacción de Mitsunobu mediada por PPh_3/DIAD con maleimida en exceso que proporcionó un rendimiento del 25 % de **2**.

Se prepararon reactivos de azida, N-(20-azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosil)-2-bromoacetamida **9** y N-(20-azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosil)-2-yodoacetamida **9a**, a partir de 20-azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosan-1-amina (NH_2-PEG$_7$-N_3). Los grupos bromoacetilo y yodoacetilo de **9** y **9a**, respectivamente, son reactivos con ciertos grupos funcionales nucleófilos de proteínas tales como grupos tiol de cisteína para formar productos intermedios de azido-proteína. El producto intermedio de azido-proteína puede reaccionar con un reactivo de ^{18}F-PEG-alquino que tiene la fórmula:



en presencia de un catalizador de cobre, en la que n es un número entero de 2 a 12, para formar una proteína marcada.

Fluoración con ^{18}F nucleófila acelerada por microondas. Se seleccionó hidrogenocarbonato de tetrabutilamonio ($TBAHCO_3$) sobre Kryptofix 222 y K_2CO_3 (K222/K_2CO_3) como catalizador de transferencia de fase para la fluoración nucleófila de [^{18}F]FPEG$_2N_3$, [^{18}F]FPEG$_4N_3$ y [^{18}F]FPEG$_8N_3$ ([^{18}F] **4**). Como $TBAHCO_3$ presentó mayor estabilidad térmica con respecto a K222/K_2CO_3, el calentamiento con microondas a altas temperaturas aceleró la eliminación azeotrópica del agua en el plazo de 5 min. Adicionalmente, el calentamiento con microondas proporcionó una alta eficiencia de fluoración de ^{18}F (89,0 ± 1,4 %, n = 5) en 3 min para [^{18}F] **4** en acetonitrilo, con rendimientos comparables observados para [^{18}F]FPEG$_4$N. Sin embargo, se observaron rendimientos ligeramente reducidos de [^{18}F]FPEG$_2N_3$ debido a la volatilidad de los compuestos a las temperaturas usadas durante las etapas de calentamiento para la fluoración y evaporación, un problema rectificado usando tapas de abrir y cerrar para recipientes de reacción.

Preparación de [^{18}F] **5**. Se evaluaron tres sistemas catalíticos para la conjugación de [^{18}F] **4** y **2** usando la reacción de CuAAC (Tabla 1). El método A (Ejemplo 5), que emplea $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ y ascorbato de sodio como fuente de Cu^I (Glaser et al (2007) Bioconjug Chem 18:989-93), proporcionó el producto deseado en 20 min con una eficiencia de conversión del 79,3 % y una pureza del 65,7 %. El largo tiempo de reacción y la pureza limitada observados provocaron la investigación de ligandos que pueden acelerar la reacción de CuAAC. El método B añade el ligando de Cu^I, disulfonato de batofenantrolina (BPDS), al método A, que redujo espectacularmente el tiempo de reacción a 1 min, aumentó la eficiencia de conversión al 95,6 % y mejoró la pureza al 88,7 %. Para los métodos A y B, la formación de productos de degradación marcados con ^{18}F disminuyó cuando la síntesis de [^{18}F] **4** se catalizó por $TBAHCO_3$ en comparación con K222/K_2CO_3 y cuando [^{18}F] **4** se purificó con un cartucho Alumina N Light antes de la reacción de CuAAC.

El método C emplea reactivos compatibles con acetonitrilo tales como $Cu(MeCN)_4PF_6$ como fuente de Cu^I, tris[(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina (TBTA) como ligando de Cu^I y 2,6-lutidina como catalizador de base (Lewis et al (2004) J. Am. Chem. Soc. 126:9152-9153; Chan et al (2004) Org. Lett. 6:2853-2855). Usando el método C, el tiempo de reacción (inferior a 5 min), la formación de productos de degradación marcados con ^{18}F (10 %) y la eficiencia de conversión (100 %) fueron comparables a los del método B. Además, la purificación en alúmina de [^{18}F] **4** antes de la reacción de CuAAC no afectó la pureza de [^{18}F] **5** y, como resultado, no se incluyó en el método C.

Después del tratamiento con SPE, el método B proporcionó [^{18}F] **5** con un rendimiento del 59 ± 4%, una pureza radioquímica del 94 % y una actividad específica de 5,1 ± 1,5 Ci/µmol (determinada contra una curva patrón de HPLC de **5** marcado con ^{19}F) en 47 ± 1 min (n = 5). La identidad de [^{18}F] **5** se confirmó por co-elución de HPLC con patrón marcado con ^{19}F y por análisis de EM/CL del producto degradado. La lipofilia (logP) de [^{18}F]**5** (-2,41 ± 0,09) se midió a pH 7,4 de acuerdo con métodos publicados (Rodionov et al (2007) J Am Chem Soc 129:12705-12).

Tabla 1 Comparación de tres métodos para la conjugación catalizada con CuAAC de [^{18}F] **4** y **2**, que incluye tiempo

de reacción, conversión de [^{18}F] **4** a [^{18}F] **5** y pureza de [^{18}F] **5** en bruto con respecto a los productos de degradación marcados con ^{18}F.

Método	Catalizadores	Tiempo (min)	% de conversión	% de pureza
A	$CuSO_4$/ascorbato	20	79,3	65,7
B	CuiSO_4/ascorbato/BPDS	1	95,6	88,7
C	$Cu(MeCN)_4PF_6$(TBTA/2,6-lutidina	5	100	90,1

Síntesis de proteínas marcadas

Los métodos de marcado de péptidos son muy conocidos. Véanse Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, (1997) Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Glazer et al (1975) Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (1984) Chemical Reagents for Protein Modification, Vols. I and II, CRC Press, New York; Pfleiderer, G. (1985) “Chemical Modification of Proteins”, Modern Methods in Proteins Chemistry, H. Tschesche, Ed., Walter DeGryter, Berlin and New York; y Wong (1991) Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez et al (2004) Chem. Eur. J. 10:1149-1155; Lewis et al (2001) Bioconjugate Chem. 12:320-324; Li et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:110-115; Mier et al (2005) Bioconjugate Chem. 16:240-237.

Los métodos descritos son rápidos y eficaces, proporcionando proteína radiomarcada con ^{18}F (^{18}F-4D5TioFab) en 82 min con un rendimiento total del 11 ± 3 % y una actividad específica de 2,0 ± 0,2 Ci/µmol (Gill et al (2009) Jour. Med. Chem. 52(19):5816-5825). ^{18}F-4D5TioFab retuvo la actividad biológica de proteína nativa y se validó satisfactoriamente *in vivo* con obtención de imágenes de microTEP de la expresión de HER2 en un modelo murino que lleva tumor de xenoinjerto modulado por el inhibidor de Hsp90, 17-AAG. La eficiencia de conjugación de [^{18}F] 5 y 4D5TioFab se probó en función de la concentración de proteína, pH y tiempo (Tabla 2). A medida que aumentaron la concentración de proteína y el pH, se redujo el tiempo de conjugación y se observó elevada eficiencia. No se observó un aumento significativo en la degradación de [^{18}F]5 o agregación de 4D5TioFab a pH 8 con respecto a pH 6,5.

Las proteínas de la invención incluyen anticuerpos manipulados con cisteína en los que uno o más aminoácidos de cualquier forma del anticuerpo no mutante o parental se sustituyen con un aminoácido de cisteína. El aminoácido de cisteína manipulado es un ácido de cisteína libre y no es parte de una unidad de disulfuro intracatenario o intercatenario. Cualquier forma de anticuerpo puede manipularse así, es decir, mutarse. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo Fab parental puede manipularse para formar un Fab manipulado con cisteína, denominado en el presente documento “TioFab”. Similarmente, un anticuerpo monoclonal parental puede manipularse para formar un “TiomAb”. Debe observarse que una mutación de un único sitio da un único residuo de cisteína modificado en un TioFab, mientras que una mutación de un único sitio da dos residuos de cisteína manipulados en un TiomAb, debido a la naturaleza dímera del anticuerpo IgG. Los anticuerpos manipulados con cisteína de la invención incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos monoclonales humanizados o quiméricos, fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos, polipéptidos de fusión y análogos que se unen preferencialmente a polipéptidos asociados a la célula. Los anticuerpos manipulados con cisteína retienen la capacidad de unión al antígeno de sus homólogos de anticuerpo no mutantes.

La purificación de ^{18}F-TioFab se realizó en una columna de desalación NAP-5 y columna de SEC-HPLC Bio-Sep S-2000 (sistema D). El método de NAP-5 proporcionó co-elución significativa de [^{18}F] 5 sin conjugar con 4D5TioFab, particularmente para reacciones con una baja eficiencia de conjugación. La SEC-HPLC Bio-Sep S-2000 separó ^{18}F-4D5TioFab de agregados marcados con ^{18}F y [^{18}F] 5 (y productos de degradación marcados con ^{18}F). El producto purificado final, ^{18}F-4D5TioFab, se analizó por el sistema A de HPLC, sistema C y TOF EM/CL. El procedimiento de conjugación optimizado proporcionó ^{18}F-4D5TioFab con un rendimiento del 26 ± 7%, con más del 90 % de pureza radioquímica, y una actividad específica de 2,0 ± 0,2 Ci/µmol (n = 5). El tiempo de síntesis total fue 82 ± 4 min desde el inicio de la síntesis y el rendimiento corregido de degradación total fue **11** ± 3 %.

Tabla 2 Eficiencia de conjugación de [^{18}F] **5** (5 mCi, 1 nmol) con 4D5TioFab (100 µg, 2 nmoles) contra la concentración de proteína, pH y tiempo. El procedimiento para la preparación de [^{18}F] **5** estuvo de acuerdo con la producción rutinaria; sin embargo, fracciones iguales de [^{18}F] 5 (en acetonitrilo después del tratamiento con SPE) se distribuyeron en diez viales de reacción, se evaporaron y se añadió 4D5TioFab.

	Conc. de proteína	Rendimiento (%)		
pH	(mg/ml)	10 min	30 min	60 min
6,5	0,5	26	39	44
6,5	1,0	26	42	53
6,5	2,0	47	66	74
7,2	1,0	64	74	77
8,0	1,0	79	85	85

Además de ser precursores de la síntesis de [^{18}F]FPEGMA, (Figura 1), [^{18}F]FPEG-propargilo y [^{18}F]FPEGN$_3$ pueden conjugarse directamente con proteínas mediante la reacción de CuAAC (Figura 2). Este enfoque reduce la síntesis de proteína marcada con ^{18}F a dos etapas radioquímicas y proporciona un método alternativo para realizar conjugaciones específicas de sitio. Se observó la pre-conjugación de propargil-PEG-maleimida (**2**) con TioFab seguido de CuAAC directa entre [^{18}F] **4** y propargil-PEG-TioFab usando un sistema de BPDS/Cu(MeCN)$_4$OTf (3:1, BPDS 3 mM) con eficiencias de conjugación de hasta el 15 %. Se empleó un método similar para acoplar [^{18}F]FPEG$_3$-propargilo con una nanopartícula de dextrano-óxido de hierro (CLIO) reticulada modificada con azida-PEG con altas eficiencias de conjugación resultantes de la presencia de numerosos sitios de azida (Devaraj et al (2009) “18F Labeled Nanoparticles for in Vivo PET-CT Imaging” Bioconjug Chem 10,1021/bc8004649). Esta técnica puede proporcionar una alta actividad específica de proteínas marcadas con ^{18}F, ya que [^{18}F] **4** es estable y múltiples grupos azida o alquino pueden posicionarse selectivamente sobre una proteína sin las posibilidades de reactividad cruzada. Sin embargo, como Cu^{II} en presencia de ascorbato tiende a degradar proteínas (Devaraj et al (2009) “18F Labeled Nanoparticles for in Vivo PET-CT Imaging” Bioconjug Chem 10,1021/bc8004649), este método requiere la rigurosa exclusión de oxígeno, el uso de agentes reductores o el uso de un ligando estabilizante de Cu^{I} tal como BPDS para limitar la escisión de proteínas. Finalmente, [^{18}F]FPEG-propargilo y [^{18}F]FPEGN$_3$ son grupos prostéticos marcados con ^{18}F para el desarrollo de péptidos marcados con ^{18}F. En realidad, el grupo prostético que lleva propargilo, [^{18}F]FPy5yne (Inkster et al (2008) Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals 51:444-452) se evaluó recientemente con un péptido modificado con azida similar al método C.

La conjugación específica de sitio de [^{18}F] **5** con 4D5TioFab se optimizó con respecto a la velocidad de reacción y la estabilidad del reactante. Con respecto a la estabilidad de proteínas que llevan tiol, que generalmente disminuye a media que aumenta el pH y la concentración de proteína, no se observó un aumento en la dimerización y agregación de 4D5TioFab a través del intervalo de pH (6,5-8) y concentración de proteína (1-2 mg/ml) usado para generar la Tabla 2. Sin embargo, la formación de enlaces disulfuro no deseados para proteínas que llevan tiol depende probablemente de la accesibilidad del grupo tiol. Para 4D5TioFab, el método PHESELECTOR de seleccionar la posición de sustitución de cisteína óptima puede promover la estabilidad del tiol permitiendo el uso de mayor pH y concentración de proteína durante una duración prolongada. No se observó dependencia de la estabilidad de [^{18}F] 5 durante la reacción de conjugación del pH a través del intervalo probado en la Tabla 2, implicando la introducción de un reactante externo, tal como sílice depositada de la columna de HPLC o cartucho de SPE, en el sistema de reacción de conjugación que puede degradar [^{18}F] **5** de una manera dependiente de la concentración. Por tanto, deberá tenerse cuidado cuando se limpia el material de vidrio y se seleccionan disolventes apropiados, columnas de HPLC y cartuchos de SPE. Considerando la independencia del pH observada de la estabilidad 4D5TioFab y [^{18}F] **5**, se seleccionaron condiciones de reacción básicas (pH 8) para promover la mayor eficiencia de conjugación antes de que se produjera la completa degradación de [^{18}F] **5**.

La estabilidad de [^{18}F]FPEGMA **5** tiene un impacto significativo sobre la eficiencia de conjugación y actividad específica. La eficiencia de conjugación de [^{18}F] **5** con 4D5TioFab depende de la cantidad total de **5** intacto (marcado con ^{18}F y ^{19}F) contra la cantidad total de 4D5TioFab (ya que cada TioFab tiene un grupo tiol accesible). La cantidad total de **5** intacto se calcula a partir de la actividad total, actividad específica y degradación fraccionaria de [^{18}F] **5**. Por ejemplo, suponiendo por ahora que no está presente degradación de [^{18}F] **5**, los valores informados de 5 Ci/µmol y 200 mCi para [^{18}F] **5** proporcionan 40 nmoles de **5** totales. Por tanto, se requieren 40 nmoles de grupos tiol (aproximadamente 2 mg de 4D5TioFab) para obtener eficiencia de conjugación máxima; sin embargo, como se usa 1 mg de 4D5TioFab durante la producción rutinaria, la eficiencia de conjugación esperada es de aproximadamente el 50 %. La eficiencia de conjugación observada del 26,7 % indica que solo aproximadamente la mitad del 4D5TioFab total se ha conjugado, que se confirma generalmente por integración de los picos nativos y conjugados obtenidos por espectrometría de masas para ^{18}F-4D5TioFab degradado. La desviación en la eficiencia de conjugación observada de la esperada es un resultado de la degradación de [^{18}F] **5**, usado como reactivo limitante durante la conjugación con TioFab. Mejoras adicionales en la eficiencia de conjugación y actividad específica pueden resultar del uso de mayores concentraciones de proteína o un elemento estructural más estable.

Obtención de imágenes de proteínas marcadas con ^{18}F

Los anticuerpos manipulados con cisteína marcados de la invención son útiles como biomarcadores y sondas de obtención de imágenes por los diversos métodos y técnicas de obtención de imágenes biomédicas y moleculares tales como: (i) IRM (imagen por resonancia magnética); (ii) MicroCT (tomografía computarizada); (iii) SPECT (tomografía computarizada por emisión de fotón único); (iv) TEP (tomografía de emisión de positrones) Chen et al (2004) Bioconjugate Chem. 15:41-49; (v) bioluminiscencia; (vi) fluorescencia; y (vii) ultrasonidos. La inmunoescintigrafía es un procedimiento de obtención de imágenes en el que anticuerpos marcados con sustancias radiactivas se administran a un animal o paciente humano y se toma una imagen de sitios en el cuerpo en los que el anticuerpo se localiza (documento US 6528624). Los biomarcadores de obtención de imágenes pueden medirse y evaluarse objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patógenos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Los biomarcadores pueden ser de varios tipos: Tipo 0 son marcadores de la historia natural de una enfermedad y se correlacionan longitudinalmente con índices clínicos conocidos, por ejemplo, evaluación de IRM de inflamación sinovial en artritis reumatoide; los marcadores de tipo I capturan el efecto de una intervención según un mecanismo de acción, aun cuando el mecanismo puede no

asociarse con un desenlace clínico; la función de los marcadores de tipo II como criterios de valoración sustitutos en los que el cambio en, o señal de, el biomarcador predice un beneficio clínico para "validar" la respuesta elegida como diana, tal como erosión ósea medida en artritis reumatoide por TAC. Así, los biomarcadores de obtención de imágenes pueden proporcionar información terapéutica farmacodinámica (FD) sobre: (i) expresión de una proteína diana, (ii) unión de un agente terapéutico a la proteína diana, es decir, selectividad, y (iii) datos farmacocinéticos de eliminación y semivida. Las ventajas de los biomarcadores de obtención de imágenes *in vivo* con respecto a los biomarcadores basados en laboratorio incluyen: tratamiento no invasivo, cuantificable, evaluación del cuerpo entero, dosificación y evaluación repetitiva, es decir, múltiples momentos de tiempo, y efectos posiblemente transferibles de resultados preclínicos (animal pequeño) a clínicos (ser humano). Para algunas aplicaciones, la obtención de imágenes biológicas sustituye o minimiza el número de experimentos en animales en estudios preclínicos.

Terapia dirigida a Hsp90 y obtención de imágenes por microTEP. Se distribuyeron ratones en dos grupos (n = 4) según la captación por el tumor y volumen como se ha determinado por ^{18}F-4D5TioFab un día antes del tratamiento con 17-AAG (Gill et al (2009) Jour. Med. Chem. 52(19):5816-5825). Se administró 17-AAG al grupo tratado en el día 0, mientras que los animales del grupo de control se dejaron sin tratar. La obtención de imágenes de TEP con ^{18}F-4D5TioFab se realizó en el día 1 (catorce horas después de la administración de la última dosis de 17-AAG), día 5, y día 7. Rebanadas coronales a través del tumor de animales de control y animales tratados con 17-AAG un día antes y un día después de la terapia se muestran en la Figura 5a. La captación por el tumor promedio en grupos de control y tratados durante un periodo de una semana se muestra en la Figura 5b, y la captación en tejidos seleccionados y órganos secretores se enumeran en la Tabla 3. La obtención de imágenes de TEP en el día 1 reveló una reducción del 50 % (P = 0,00046) en la captación tumoral en comparación con el grupo de control y la captación medida en el día -1 (P = 0,00025) (Tabla 3). La eliminación renal de ^{18}F-4D5TioFab fue predominante con acumulación significativa de radiactividad en la vejiga y alta captación en la corteza renal (Tabla 3). La vía hepatobiliar también contribuyó a la eliminación del trazador, conduciendo a la acumulación de metabolitos radiactivos en el intestino grueso y la vesícula biliar mientras que la retención de radiactividad en el hígado fue relativamente baja. El peso corporal y el tamaño del tumor no cambiaron durante los siete días de obtención de imágenes.

Tabla 3 Captación promedio de ^{18}F-4D5TbioFab en tejidos seleccionados de animales antes del tratamiento (día -1) y después del tratamiento (día 1, 5 y 7). La captación renal se midió en la corteza y la captación de sangre se midió en el ventrículo izquierdo. Los datos se presentan como media ± d.e.

Tejido tratado con 17-AAG	Captación (% de DI/g)			
	día -1	día 1	día 5	día 7
Vejiga	90,76 ± 23,40	63,05 ± 23,08	57,89 ± 9,11	47,11 ± 32,10
Sangre	0,80 ± 0,06	1,31 ± 0,23	0,97 ± 0,04	0,67 ± 0,07
Cerebro	0,08 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,08± 0,01	0,06 ± 0,01
Vesícula biliar	3,59 ± 1,43	4,05 ± 1,86	3,58 ± 0,32	1,97 ± 0,71
Riñón	15,26 ± 3,02	20,54 ± 4,97	20,48 ± 6,47	23,92 ± 6,98
Intestino grueso	3,96 ± 2,05	4,05 ± 1,47	3,54 ± 1,61	4,19 ± 0,97
Hígado	0,62 ± 0,06	0,97 ± 0,08	0,82 ± 0,10	0,54 ± 0,04
Músculo	0,29 ± 0,03	0,33 ± 0,04	0,25 ± 0,02	0,21 ± 0,04
Piel	0,44 ± 0,09	0,50 ± 0,05	0,48 ± 0,02	0,37 ± 0,04
Tumor	1,31 ± 0,13	0,65 ± 0,09	1,36 ± 0,34	1,66 ± 0,27

La alta actividad específica observada por ^{18}F-4D5TioFab de [^{18}F] 5 permitió una reducción en la dosis inyectada total de 4D5TioFab, que puede demostrar ser importante para la saturación del receptor y la captación de diana, particularmente para células con bajos niveles de expresión de receptor de la superficie celular. Sin embargo, para el estudio de modulación de 17-AAG tratado más abajo, la captación por el tumor no dependió de la dosis de 4D5TioFab total (30-120 µg/animal). La captación por el tumor independiente de la dosis de ^{18}F-4D5TioFab puede resultar de altos niveles de expresión de HER2 para la línea celular BT474M1, que limita las posibilidades de saturación del receptor en la dosificación aplicada.

Después de optimizar la conjugación de [^{18}F] 5 con 4D5TioFab, la actividad biológica de ^{18}F-4D5TioFab resultante se validó por análisis de Scatchard, en el que no se observó cambio significativo en la afinidad del conjugado en comparación con 4D5TioFab nativo. Además, el 4D5TioFab diseñado por el método PHESELECTOR y empleado como una proteína de tiol modelo retuvo la afinidad del 4D5Fab parental (K_d = 0,1 nM). Validación biológica adicional incluyó un estudio de respuesta al tratamiento de xenoinjertos de tumor que expresan en exceso HER2 en un modelo murino modulado por el inhibidor de HSP90, 17-AAG.

HER2 es una tirosina cinasa de receptor de la familia de factores de crecimiento epidérmico de los receptores transmembranarios y es una diana importante para el desarrollo de agentes terapéuticos para cáncer de mama. 17-AAG dirige la chaperona molecular Hsp90 responsable del correcto plegamiento, estabilidad y función de amplio intervalo de oncoproteínas que incluyen HER2. Se ha descrito el efecto de 17-AAG sobre tumores positivos para HER2 (Solit et al (2002) Clin Cancer Res 8:986-93). Se investigó el efecto de 17-AAG sobre el nivel de expresión de HER2 en un modelo murino de xenoinjerto de cáncer de mama (BT474) con trastuzumab-F(ab')$_2$ conjugado con ^{68}Ga-DOTA (^{68}Ga-DCHF) (Smith-Jones et al (2006) J Nucl Med 47:793-6; Smith-Jones et al (2004) Nat Biotechnol 22:701-6). Se observó una reducción del 70 % en los niveles de HER2 que duraron cinco días, seguido de un

regreso a niveles de pretratamiento después de 12 días, sugiriendo que ^{68}Ga-DCHF puede monitorizar la respuesta tumoral al tratamiento con 17-AAG más pronto que ^{18}FDG PET. Sin embargo, la corta semivida de ^{68}Ga (68 min) no coincide idealmente con la semivida en plasma relativamente larga de F(ab)'$_2$ y una significativa disminución de señal es inherente dentro del periodo de tres horas requerido antes de la adquisición de PET. La semivida en plasma relativamente corta de fragmentos Fab monovalentes en combinación con ^{18}F (110 min) puede proporcionar propiedades de obtención de imágenes mejoradas (Williams et al (2001) Cancer Biother Radiopharm 16:25-35).

La disminución observada de la expresión de HER2 (Figura 5) fue ampliamente comparable a la observada por Smith-Jones con el agente de obtención de imágenes basado en F(ab')$_2$. La menor disminución (50 %) en la captación por el tumor de ^{18}F-4D5TioFab un día después de la terapia con 17-AAG (Figura 5) en comparación con la disminución observada por Smith-Jones et al usando ^{68}Ga-DCHF (70 %) puede atribuirse a varios factores. Aunque la rápida eliminación renal de ^{18}F-4D5TioFab proporciona una relación mejorada de tumor con respecto a fondo, un fragmento Fab monovalente tiene una menor captación por el tumor de nivel inicial en comparación con F(ab')$_2$ bivalente. Suponiendo una captación por el tumor post-tratamiento similar para Fab y F(ab')$_2$, resultante de la captación no específica y distribución en la vasculatura del trazador como se muestra en la Figura 5a (arriba derecha), la diferencia de porcentaje para la captación de trazador puede estar sesgada contra el compuesto con una menor señal de magnitud antes del tratamiento. Esto está reforzado por la observación de que la captación por el tumor promedio 0,65 ± 0,09 % de DI/g después del tratamiento con 17-AAG (día 1) fue aproximadamente comparable a la captación por la piel 0,50 ± 0,05 % de DI/g como se muestra en la Tabla 3. Adicionalmente, como 17-AAG tiene solubilidad en agua limitada, la formulación (que consiste en una emulsión de liposomas basados en fosfolípido de huevo preparada por sonicación) puede no haber reproducido la potencia informada. Esto puede explicar la recuperación más rápida de la expresión de HER2 en el experimento (100 % en el día 5). Aunque la magnitud de la disminución de la señal después del tratamiento con 17-AAG fue ligeramente inferior a la previamente observada (Smith-Jones et al (2006) J Nucl Med 47:793-6; Smith-Jones et al (2004) Nat Biotechnol 22:701-6), la calidad de la imagen obtenida con ^{18}F-4D5TioFab (Figura 5) fue superior en comparación con ^{68}Ga-DCHF. La rápida eliminación renal del fragmento Fab y la mejora resultante para la relación de tumor con respecto a fondo superó a la magnitud absoluta reducida de la captación por el tumor en comparación con el fragmento F(ab')$_2$. Esto facilitó la adquisición de datos solo dos horas, o aproximadamente una semivida, después de la administración de trazador que proporcionó más señal que el periodo de casi tres semividas antes de la obtención de imágenes con ^{68}Ga-DCHF.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas o formulaciones de la presente invención incluyen una proteína marcada de la invención, y uno o más vehículos, deslizantes, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas engloban tanto la composición a granel como unidades de dosificación individuales compuestas por más de un (por ejemplo, dos) agente farmacéuticamente activo que incluye una proteína marcada junto con cualquier excipiente, diluyente, vehículo o deslizante farmacéuticamente inactivo. La composición a granel y cada unidad de dosificación individual puede contener cantidades fijas de los agentes farmacéuticamente activos anteriormente dichos. La composición a granel es material que todavía no se ha formado en unidades de dosificación individuales. Una unidad de dosificación ilustrativa es una unidad de dosificación oral tal como comprimidos, píldoras, cápsulas y similares. Similarmente, los métodos de administración de una composición farmacéutica a un paciente también pretenden englobar la administración de la composición a granel y unidades de dosificación individuales.

Las composiciones farmacéuticas también engloban compuestos isotópicamente marcados de la presente invención que son idénticos a aquellos citados en el presente documento, pero por el hecho de que uno o más átomos están sustituidos con un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferentes de la masa atómica o número másico normalmente encontrado en la naturaleza. Todos los isótopos de cualquier átomo o elemento particular como se especifica están contemplados dentro del alcance de los compuestos de la invención, y sus usos. Isótopos a modo de ejemplo que pueden incorporarse en los compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor, cloro y yodo, tales como ^{2}H, ^{3}H, ^{11}C, ^{13}C, ^{14}C, ^{13}N, ^{15}N, ^{15}O, ^{17}O, ^{18}O, ^{32}P, ^{33}P, ^{35}S, ^{18}F, ^{36}Cl, ^{123}I y ^{125}I. Ciertos compuestos isotópicamente marcados de la presente invención (por ejemplo, aquellos marcados con ^{3}H y ^{14}C) son útiles en ensayos de distribución en tejido de compuesto y/o sustrato. Los isótopos tritiados (^{3}H) y de carbono-14 (^{14}C) son útiles por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio (^{2}H) puede proporcionar ciertas ventajas de diagnóstico resultantes de mayor estabilidad metabólica (por ejemplo, elevada semivida *in vivo* o reducidos requisitos de dosificación) y, por tanto, puede preferirse en algunas circunstancias. Los isótopos emisores de positrones tales como ^{15}O, ^{13}N, ^{11}C y ^{18}F son útiles para estudios de tomografía de emisión de positrones (TEP) para examinar la ocupación por receptor del sustrato. Los compuestos isotópicamente marcados de la presente invención pueden generalmente prepararse siguiendo procedimientos análogos a los desvelados en los ejemplos en el presente documento, sustituyendo un reactivo no isotópicamente marcado con un reactivo isotópicamente marcado.

Vehículos, diluyentes, aditivos y excipientes adecuados son muy conocidos para aquellos expertos en la materia e incluyen materiales tales como hidratos de carbono, ceras, polímeros solubles en agua y/o hinchables, materiales hidrófilos o hidrófobos, gelatina, aceites, disolventes, agua y similares. El vehículo, diluyente o excipiente particular usado dependerá de los medios y fin para los que el compuesto de la presente invención está siendo aplicado. Los disolventes se seleccionan generalmente basándose en disolventes reconocidos por expertos en la materia como seguros (GRAS) para ser administrados a un mamífero. En general, los disolventes seguros son disolventes acuosos no tóxicos tales como agua y otros disolventes no tóxicos que son solubles o miscibles en agua. Disolventes acuosos adecuados incluyen agua, etanol, propilenglicol, polietilenglicoles (por ejemplo, PEG 400, PEG 300), sulfóxido de dimetilo (DMSO), Cremophor (por ejemplo CREMOPHOR EL®, BASF) y mezclas de los mismos. Las formulaciones también pueden incluir uno o más tampones, agentes estabilizantes, tensioactivos, humectantes, lubricantes, emulsionantes, agentes de suspensión, conservantes, antioxidantes, opacificantes, deslizantes, adyuvantes de procesamiento, colorantes, edulcorantes, perfumantes, aromatizantes y otros aditivos conocidos para proporcionar una presentación eficaz del fármaco (es decir, un compuesto de la presente invención o composición farmacéutica del mismo) o ayudar en la fabricación del producto farmacéutico (es decir, medicamento).

Las formulaciones pueden prepararse usando procedimientos de disolución y mezcla convencionales. Por ejemplo, el principio activo a granel (es decir, compuesto de la presente invención o forma estabilizada del compuesto (por ejemplo, complejo con un derivado de ciclodextrina u otro agente de complejación conocido) se disuelve en un disolvente adecuado en presencia de uno o más de los excipientes descritos anteriormente. El compuesto de la presente invención normalmente se formula en formas de dosificación farmacéuticas para proporcionar una dosificación fácilmente controlable del fármaco y para permitir el cumplimiento del paciente con la pauta prescrita.

La composición farmacéutica (o formulación) para administración puede envasarse en varias formas que dependen del método usado para administrar el fármaco. Generalmente, un artículo para distribución incluye un recipiente que tiene depositado en su interior la formulación farmacéutica en una forma apropiada. Recipientes adecuados son muy conocidos para aquellos expertos en la materia e incluyen materiales tales como botellas (plástico y vidrio), sobres, ampollas, bolsas de plástico, cilindros metálicos y similares. El recipiente también puede incluir un montaje con cierre inviolable para prevenir el acceso indiscreto al contenido del envase. Además, el recipiente tiene depositado sobre él una etiqueta que describe el contenido del recipiente. La etiqueta también puede incluir advertencias apropiadas.

Las formulaciones farmacéuticas de los compuestos de la presente invención pueden prepararse para diversas vías y tipos de administración. Por ejemplo, una proteína marcada que tiene el grado deseado de pureza puede opcionalmente mezclarse con diluyentes, vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences (1995) 18th edition, Mack Publ. Co., Easton, PA), en forma de una formulación liofilizada, polvo molido o una solución acuosa. La formulación puede realizarse mezclando a temperatura ambiente al pH apropiado, y al grado deseado de pureza, con vehículos fisiológicamente aceptables, es decir, vehículos que son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. El pH de la formulación depende principalmente del uso particular y la concentración de compuesto, pero puede oscilar de aproximadamente 3 a aproximadamente 8. La formulación farmacéutica es preferentemente estéril. En particular, las formulaciones que van a usarse para administración *in vivo* deben ser estériles. Tal esterilización se realiza fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles. La formulación farmacéutica generalmente puede almacenarse como una composición sólida, una formulación liofilizada o como una solución acuosa.

Las formulaciones farmacéuticas de la invención se dosificarán y administrarán en una forma, es decir, cantidades, concentraciones, programas, ciclo, vehículos y vía de administración, de acuerdo con la buena práctica médica. Factores para consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se diagnostica o se trata, el mamífero particular que está tratándose, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la programación de la administración, y otros factores conocidos para los médicos. La “cantidad farmacéuticamente eficaz” del compuesto que va a administrarse estará gobernada por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para diagnosticar, prevenir, mejorar o tratar el trastorno.

La cantidad farmacéuticamente eficaz inicial de la proteína marcada administrada por vía oral o parenteralmente por dosis estará en el intervalo de aproximadamente 0,01-1000 mg/kg, concretamente aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal del paciente por día, siendo el intervalo inicial típico del compuesto usado 0,3 a 15 mg/kg/día. La dosis de la proteína marcada y la dosis del agente quimioterapéutico que van a administrarse pueden oscilar para cada uno de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg por forma de dosificación unitaria, o de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg por forma de dosificación unitaria. Las dosis de proteína marcada y el agente quimioterapéutico pueden administrarse en una relación de aproximadamente 1:50 a aproximadamente 50:1 en peso, o en una relación de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 10:1 en peso.

Diluyentes, vehículos, excipientes y estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol

butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, CREMOPHOR EL®, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Los componentes farmacéuticos activos también pueden ser atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas de albúmina) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 18th edition, (1995) Mack Publ. Co., Easton, PA.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen aquellas adecuadas para las vías de administración detalladas en el presente documento. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos muy conocidos en la técnica de la farmacia. Las técnicas y formulaciones generalmente se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences 18th Ed. (1995) Mack Publishing Co., Easton, PA. Tales métodos incluyen la etapa de poner en asociación el principio activo con el vehículo que constituye uno o más componentes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo uniformemente e íntimamente en asociación el principio activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y entonces, si fuera necesario, moldeando el producto.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, tal como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse según la técnica conocida usando aquellos dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril puede ser una solución o una suspensión en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, tal como una solución en 1,3-butanodiol, o prepararse a partir de un polvo liofilizado. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, aceites no volátiles estériles pueden emplearse convencionalmente como disolvente o medio de suspensión. Para este fin puede emplearse cualquier aceite no volátil suave que incluye mono- o diglicéridos sintéticos. Además, asimismo pueden usarse ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables.

La cantidad de principio activo que puede combinarse con el material de vehículo para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del huésped y el modo particular de administración. Por ejemplo, una solución acuosa prevista para infusión intravenosa puede contener de aproximadamente 3 a 500 µg del principio activo por mililitro de solución con el fin de que pueda producirse la infusión de un volumen adecuado a una tasa de aproximadamente 30 ml/h.

Formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y espesantes.

Las formulaciones pueden envasarse en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en una condición secada por congelación (liofilizada) que solo requiere la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua, para inyección inmediatamente antes de uso. Se preparan soluciones y suspensiones para inyección extemporánea a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo previamente descrito. Formulaciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis diaria o sub-dosis diaria unitaria, como se cita en el presente documento, o una fracción apropiada de la misma, del principio activo.

Metabolitos de proteínas marcadas

También se describen los productos metabólicos *in vivo* de proteínas marcadas descritas en el presente documento. Tales productos pueden resultar, por ejemplo, de la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, desamidación, esterificación, desesterificación, escisión enzimática y similares, del compuesto administrado. Por consiguiente, la invención incluye metabolitos de proteínas marcadas, que incluyen compuestos producidos por un proceso que comprende poner en contacto un compuesto de la presente invención con un mamífero durante un periodo de tiempo suficiente para dar un producto metabólico del mismo. Las estructuras de metabolito pueden determinarse de manera convencional, por ejemplo, por análisis de EM, EM/CL o RMN. En general, el análisis de metabolitos se hace de la misma forma que los estudios de metabolismo de fármacos convencionales muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Los productos de metabolitos, mientras que no se encuentren de otro modo *in vivo*, son útiles en ensayos de diagnóstico para la dosificación terapéutica de los compuestos de la invención.

Artículos de fabricación

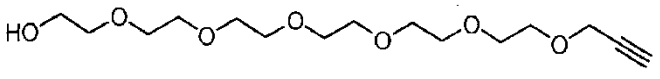
Un artículo de fabricación, o “kit”, que contiene proteínas marcadas útiles para el diagnóstico de enfermedades y trastornos se describe en una realización, el kit comprende un recipiente que comprende una proteína marcada. El kit puede comprender además una etiqueta o prospecto, sobre o asociada al recipiente. El término “prospecto” se usa para referirse a instrucciones normalmente incluidas en envases comerciales de productos de diagnóstico, que contienen información sobre el uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias referentes al uso de tales productos de diagnóstico. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, envase alveolado, etc. El recipiente puede formarse de varios materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente puede contener una proteína marcada o una formulación de la misma y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es una proteína marcada. En una realización, la etiqueta o prospectos indican que la composición que comprende una proteína marcada puede usarse para diagnosticar un trastorno resultante de crecimiento celular anormal. La etiqueta o prospecto puede también indicar que la composición puede usarse para diagnosticar otros trastornos. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas. El kit puede comprender además indicaciones para la administración de la formulación farmacéutica de la proteína marcada.

Ejemplos

Los métodos y reactivos de Gill et al (2009) Jour. Med. Chem. 52(19):5816-5825.

Los disolventes y productos químicos se compraron de Aldrich (Milwaukee, WI), a menos que se establezca de otro modo. Se compraron polietilenglicoles heterobifuncionales de Iris Biotech (Marktredwitz, Alemania) y N_3-PEG_8-NHS se compró de Quanta Biodesign (Powell, OH). Se compró fosfolípido de huevo de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) y se obtuvo 17-(alilamino)-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG) de InvivoGen (San Diego, CA). Se usaron los siguiente sistemas de HPLC de fase inversa para analizar y purificar los productos. Sistema A: Phenomenex Jupiter C18 300 Å (150 × 4,6 mm, 5 µm), 0,05 % de TFA + 10-90 % de acetonitrilo, 0-7 min, 20-90 % de acetonitrilo, 7 min, 2 ml/min; sistema B: Phenomenex Luna C18 (250 × 10 mm, 5 µm) 0,05 % de TFA + acetonitrilo, 5 ml/min; sistema C: Phenomenex BioSep-SEC-S 2000 (300 × 4,60 mm, 5 µm) PBS 50 mM 0,5 ml/min; sistema D: Phenomenex BioSep-SEC-S 2000 (300 × 7,80 mm, 5 µm) PBS 20 mM a pH 7,2 1,0 ml/min; sistema E: Altima C-18 (100 × 22,0 mm, 5 µm) 0,05 % de TFA + 10-60 % de acetonitrilo, 0-30 min, 24 ml/min. Tanto los sistemas de HPLC analíticos como semi-preparativos usados en radioquímica estuvieron equipados con detector de absorbancia de UV y de radiactividad (PMT). Se compró [^{18}F]fluoruro de PETNET Solutions (Palo Alto, CA). Se obtuvieron cartuchos Oasis HLB Plus de Waters (Milford, MA). Se compraron columnas ^{18}F Trap & Release (8 mg) de ORTG, Inc. (Oakdale, TN). Se realizó análisis de espectrometría de masas de productos de bajo peso molecular sobre el sistema PE Sciex API 150EX LCMS equipado con la columna Onyx Monolithic C_{18}. El análisis de EM/CL de proteínas se realizó en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo TSQ Quantum con intervalo de masa extendido (Thermo Electron). Las muestras se purificaron por cromatografía en una columna MicroBore PRLP-S, 1000 Å, (50 mm x 2,1 mm, Polymer Laboratories) calentada a 75 ºC. Se usó un gradiente lineal del 30-40 % de B (disolvente A, 0,05 % de TFA en agua; disolvente B, 0,04 % de TFA en acetonitrilo) y el eluyente se ionizó directamente usando la fuente de electropulverización. Los datos se recogieron por el sistema de datos Xcalibur y la deconvolución se realizó usando ProMass (Novatia). Los espectros de RMN se registraron en el espectrómetro Bruker Avance II 500 o Bruker Avance II 400 a 298 K. Los desplazamientos químicos de ^{1}H y ^{13}C se informan con respecto a TMS y los desplazamientos químicos de ^{19}F se informan usando TFA como referencia externa normalizada a -78,5 ppm. Se usó el calentador de microondas modelo 521, Resonance Instruments (Skokie, IL), para reacciones radioquímicas. TBTA (Tris-[(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina, también conocido como tris-(benciltriazolilmetil)amina), un ligando estabilizante para Cu (I), se sintetizó según el procedimiento previamente publicado con un rendimiento del 40 % (Lewis, et al (2004) J Am Chem Soc 126:9152-3). Se compraron cartuchos Strata SDB-L de Phenomenex (Torrance, CA).

Ejemplo 1 3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicos-20-in-1-ol **1**

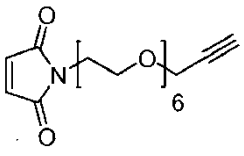


1

Se añadió hidruro de sodio, dispersión al 60 % en aceite mineral, (0,86 g, 21,4 mmol) en porciones a la solución de hexaetilenglicol (5,5 g, 19,4 mmol) en THF anhidro (40 ml) a 0 ºC (Figura 3). La mezcla de reacción se agitó a 0 ºC durante 15 minutos, a continuación se añadió gota a gota bromuro de propargilo, 80 % en tolueno (2,4 ml, 21,4 mmol). La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas. El bromuro de sodio formado se eliminó por filtración y el disolvente se evaporó. El producto en bruto se purificó sobre columna de SiO_2 usando el gradiente de metanol/diclorometano 0 - 100 % dando 3,4 g (54 %) de 1 como un aceite incoloro. RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$): δ 2,45 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H), 2,74 (sa, 1H), 3,61-3,71 (m, 24H), 4,21 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H); RMN ^{13}C

(100,6 MHz, $CDCl_3$): δ 58,4, 61,7, 69,1, 70,3-70,6, 72,5, 74,5, 79,7; EM-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calc. para $C_{15}H_{29}O_7$, 321,38; hallado 321,4.

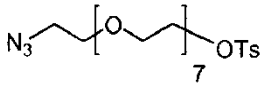
Ejemplo 2 1-(3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicos-20-in-1-il)-2,5-pirroldiona **2**



2

Se añadió gota a gota azodicarboxilato de diisopropilo (730 µl, 3,43 mmol) a la solución enfriada en hielo de 3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicos-20-in-1-ol **1** (1000 mg, 3,12 mmol), trifenilfosfina (900 mg, 3,43 mmol) y maleimida (456 mg, 4,70 mmol) en THF anhidro (20 ml) bajo atmósfera de nitrógeno (Figura 3). La solución marrón resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó a presión reducida y el producto en bruto se purificó sobre una columna de SiO_2 usando el gradiente de hexanos/acetato de etilo 0-100 % dando 650 mg de aceite amarillo que posteriormente se purificó en HPLC semipreparativa (sistema E) proporcionando **2** libre de óxido de trifenilfosfina como un aceite incoloro 310 mg (25 %). RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 2,43 (t, *J* = 2,36 Hz, 1H), 3,60-3,72 (m, 24H), 4,20 (d, *J* = 2,37 Hz, 2H), 6,70 (s, 2H); RMN ^{13}C (100,6 MHz, $CDCl_3$): δ 37,2, 58,4, 67,8, 69,1, 70,1, 70,4-70,6, 74,5, 79,7, 134,1, 170,6; EM-ESI (m/z): $[M+H]^+$, calc. para $C_{19}H_{30}NO_8$, 400,19; hallado 400,0

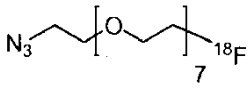
Ejemplo 3 p-toluenosulfonato de 23-azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricos-1-ilo **3**



3

Se añadió gota a gota una solución de 23-azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosan-1-ol (800 mg, 2,02 mmol) en piridina (4 ml) a la solución de cloruro de toluenosulfonilo (771 mg, 4,04 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (100 mg) en piridina (10 ml) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó y el producto en bruto se purificó sobre columna de SiO_2 usando el gradiente de hexanos/acetato de etilo 0 - 100 % seguido del gradiente de acetato de etilo/metanol 0 - 100 %, luego se purificó en HPLC semipreparativa (sistema E) dando 280 mg (25 %) de **3** como un aceite incoloro. RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 2,45 (s, 3H), 3,38 (t, *J* = 5,02 Hz, 2H), 3,58-3,70 (m, 28H), 4,16 (t, *J* = 5,00 Hz, 2H), 7,34 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,80 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H); RMN ^{13}C (100,6 MHz, $CDCl_3$): δ 21,6, 50,7, 68,7, 69,2, 70,0, 70,5-70,8, 128,0, 129,7, 133,1, 144,7; EM-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calc. para $C_{23}H_{39}N_3O_{10}S$ 549,24; hallado 549,9.

Ejemplo 4 23-azido-1-fluoro-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosano **4**

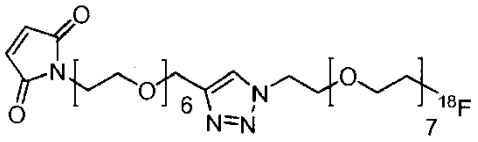


4

Se disolvió 23-azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosan-1-ol (500 mg, 1,26 mmol) en DCM (2 ml) y se enfrió a -10 ºC. Se añadió DAST (482 µl, 3,78 mmol) en porciones a la solución enfriada y la mezcla resultante se agitó a -10 ºC durante 30 minutos, luego se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 20 horas adicionales. El exceso de DAST se inactivó con metanol (5 ml) y los disolventes se evaporaron posteriormente a presión reducida. El residuo aceitoso se disolvió en agua (3 ml) y el pH se ajustó a 5 usando $NaHCO_3$. El producto en bruto se purificó en HPLC semipreparativa (sistema E) dando 122 mg (24 %) de **4** como un aceite amarillento. RMN ^1H (500 MHz, $CDCl_3$): δ 3,39 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H), 3,65-3,68 (m, 26H), 3,75 (dt, *J* = 4,2 Hz, 29,6 Hz, 2H), 4,56 (dt, *J* = 4,0 Hz, 47,5 Hz, 2H); RMN ^{13}C (125,7 MHz, $CDCl_3$): δ 50,8, 70,1, 70,4, 70,5, 70,7-70,8, 70,9, 83,2 (d, *J* = 169 Hz); RMN ^{19}F (470,6 MHz, $CDCl_3$): δ -225,9; EM-ESI (m/z): $[M+H]^+$calc. para $C_{16}H_{33}FO_7N_3$, 398,2; hallado 398,0.

Alternativamente, y para preparar $[^{18}F]$ **4**, se eluyó $[^{18}F]$fluoruro del cartucho de T&R en un vial en V de 4 ml usando 10 µl de $TBAHCO_3$ 1,3 M en 0,6 ml de acetonitrilo/agua 1:1 (v/v). El agua se eliminó azeotrópicamente por calentamiento con microondas a 60 W, 120 ºC bajo una corriente de argón (600 ccm), seguido de la adición de acetonitrilo anhidro (4 × 0,7 ml). Se añadió p-toluenosulfonato de 23-azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricos-1-ilo **3** (2 mg, 3,6 µmol) disuelto en acetonitrilo (0,6 ml) y la mezcla se calentó en microondas en un recipiente tapado con tabique a 40 W, 120 ºC durante 3 min dando $[^{18}F]$ 23-azido-1-fluoro-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosano **4**.

Ejemplo 5 1-(1-fluoro-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricos-23-il)-4-(1-(2,5-pirrolidon-1-il)-3,6,9,12,15,18-hexaoxanonadeca-19-il)-1,2,3-triazol (**5,** FPEGMA)



5

Se añadió $Cu(MeCN)_4PF_6$ (7,5 mg, 0,02 mmol) disuelto en acetonitrilo (0,1 ml) a temperatura ambiente a una solución de 1-(3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicos-20-in-1-il)-2,5-pirroldiona **2** (8,0 mg, 0,02 mmol), 23-azido-1-fluoro-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosano **4** (8,0 mg, 0,02 mmol), 2,6-lutidina (2,5 µl, 0,02 mmol) y TBTA (2,0 mg, 0 004 mmol) en acetonitrilo (0,2 ml). La mezcla resultante se agitó durante 22 horas a temperatura ambiente, luego se diluyó con agua a 4 ml, y el precipitado formado se eliminó por filtración. El filtrado que contenía el producto se purificó en HPLC semipreparativa (sistema E) proporcionando 7,5 mg (47 %) de **5** (FPEGMA) como un aceite incoloro. RMN ^1H (500 MHz, $CDCl_3$): δ 3,58-3,80 (m. 50H), 3,87 (t, *J* = 4,5 Hz, 2H), 4,53 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H), 4,55 (dt, *J* = 47,3, 4,2 Hz, 2H), 4,68 (s, 2H), 6,70 (s, 2H), 7,73 (s, 1H); RMN ^{13}C (125,7 MHz, $CDCl_3$): δ 37,2, 50,3, 64,7, 67,9, 69,5, 69,7, 70,2, 70,6-70,7, 70,9, 83,2 (d, *J* = 169 Hz), 123,8, 134,2, 145,0, 170,7; RMN ^{19}F (470,6 MHz, $CDCl_3$): δ -225,8; EM-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calc. para $C_{15}H_{62}FO_{15}N_7$,797,4; hallado 797,4; tiempo de retención de HPLC (sistema A) 2,91 min.

Método A. Alternativamente, para preparar [^{18}F] 5, [^{18}F] 23-azido-1-fluoro-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosano **4** se pasó a través de un cartucho Sep-Pak Alumina N Light, se aclaró con acetonitrilo (0,5 ml), se evaporó a casi sequedad y se enfrió a 30 ºC. El compuesto **2** (4 mg 10,0 µmol) disuelto en acetonitrilo (0,2 ml) se añadió a [^{18}F] **4**, seguido de una solución de ascorbato de sodio recientemente preparada (7,5 mg, 40 µmol) en 0,1 ml de tampón Tris a pH 8 y $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (2,2 mg, 8 µmol) en tampón Tris a pH 8 (0,2 ml) como en la Figura 4. La solución marrón-naranja resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 min, seguido de la adición de H_2O con 0,1 % de TFA (1 ml) y se suministró al bucle de HPLC para la purificación.

Método B. Alternativamente, para preparar [^{18}F] 5, [^{18}F] 23-azido-1-fluoro-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosano **4** se pasó a través de un cartucho Sep-Pak Alumina N Light, se aclaró con acetonitrilo (0,5 ml), se evaporó a casi sequedad y se enfrió a 30 ºC. El compuesto **2** (4 mg 10,0 µmol) disuelto en acetonitrilo (0,2 ml) se añadió a [^{18}F] **4**, seguido de ascorbato de sodio recientemente preparado (7,5 mg, 40 µmol) en 0,1 ml de tampón Tris a pH 8 y una mezcla de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (2,2 mg, 8 µmol) y disulfonato de batofenantrolina (BPDS) (4,4 mg, 8 µmol) en tampón Tris a pH 8 (0,2 ml). La solución marrón-naranja resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 min, seguido de la adición de H_2O con 0,1 % de TFA (1 ml) y suministro al bucle de HPLC para la purificación.

Método C. Alternativamente, para preparar [^{18}F] **5**, [^{18}F] 23-azido-1-fluoro-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosano **4** se evaporó a casi sequedad (no se requiere tratamiento con alúmina), después de lo cual se añadió el compuesto **2** (4 mg, 10,0 µmol) disuelto en acetonitrilo (0,1 ml). A continuación, se añadió una mezcla recientemente preparada de $Cu(MeCN)_4PF_6$ (3 mg, 8 µmol), TBTA (4,3 mg, 8 µmol) y 25 µl de 2,6-lutidina en acetonitrilo (0,2 ml). La solución amarilla clara resultante se agitó durante 10 min a temperatura ambiente, se concentró a 100 µl, se diluyó con H_2O con 0,1 % de TFA (1 ml) y se suministró al bucle de HPLC para la purificación.

El producto en bruto [^{18}F] **5** se purificó por HPLC semipreparativa (sistema B) con un tiempo de retención de 15-18 min. La fracción recogida se diluyó rápidamente a 20 ml con H_2O, se cargó sobre un cartucho de SPE de 60 mg Phenomenex Strata-X, el producto atrapado sobre el cartucho se aclaró con H_2O (10 ml), se lavó con aire, se eluyó con acetonitrilo (0,5 ml) en un vial en V de 1 ml y se evaporó a 30 ºC a casi sequedad con 600 ccm de argón. EM-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calc. para $C_{35}H_{62}FO_{15}N_7$ 797,4; hallado 797,4; tiempo de retención de HPLC (sistema A) 2,98 min.

Para limitar la degradación de [^{18}F] **5** en condiciones acuosas, se diseñaron optimizaciones del proceso radioquímico para minimizar el tiempo de síntesis entre la reacción de CuAAC y la recuperación de la extracción en fase sólida (SPE). Se observó un rendimiento mejorado de [^{18}F] **5** cuando el sistema de reacción de CuAAC se extinguió rápidamente con 0,1 % de TFA - agua, la HPLC se realizó a una alta velocidad de flujo (8 ml/min) y [^{18}F] **5** se cargó rápidamente y se eluyó del cartucho de SPE. La formación de los productos de degradación marcados con ^{18}F de [^{18}F] **5** aumentó con el volumen del lecho de resina de SPE y cuando el producto siguió sobre el lecho de resina durante un periodo prolongado. Así, [^{18}F] **5** se eluyó rápidamente de un cartucho de 60 mg de Phenomenex Strata-X de volumen pequeño, que proporcionó buena recuperación y niveles de impurezas aceptables.

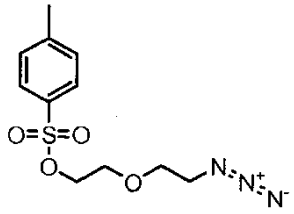
Ejemplo 6 [^{18}F]FPEGMA-Tio4D5Fab **6**

Se preparó 4D5-TioFab similar a un procedimiento previamente descrito (Junutula, J.R. et al (2008) J Immunol Methods 332:41-52; documento US 2007/0092940). Se introdujo una sustitución de cisteína en una construcción de anticuerpo de Trastuzumab (4D5, Herceptin) en la posición Val^{110} en la cadena ligera por mutagénesis dirigida al sitio. 4D5-TioMab expresado y purificado se diluyó a 1 mg/ml en Tris 25 mM, pH 8,0, y se digirió enzimáticamente a 37 ºC durante 1 h usando Lys-C (Wako) a una relación 1:1000 (peso:peso) de enzima con respecto a anticuerpo. La

digestión se detuvo con 5 µM del inhibidor de la proteasa tosil-L-lisina clorometilcetona (TLCK) y se purificó por cromatografía de intercambio iónico con cationes sobre una columna Hi-Trap SP FF de 5 ml (GE Healthcare) usando un tampón de acetato sódico 50 mM y un gradiente de 10 VC de NaCl 0-300 mM. Entonces, el TioFab aislado se preparó para conjugación por un procedimiento de reducción y oxidación para eliminar los aductos de disulfuro unidos a Cys^{110}. Primero, la proteína se redujo durante 24 h mediante la adición de tris(2-carboxietil)fosfina 2 mM (TECP) (Pierce) en un tampón que contenía MES 25 mM, pH 5,8, 300 ml de NaCl y EDTA 5 mM. Después de la reducción, la proteína se oxidó mediante la adición de ácido dehidroascórbico 5 mM (Sigma) y se purificó por filtración en gel usando una columna S200 (GE Healthcare) y un tampón que contenía MES 25 mM, pH 5,8, NaCl 300 mM y EDTA 5 mM. La proteína aislada se analizó por SDS-PAGE y espectrometría de masas para garantizar que la proteína se redujo y oxidó apropiadamente.

Se añadió 4D5TioFab (1,0 mg, 12,6 nmoles) en fosfato de sodio 100 mM a pH 8 (2 mg/ml) a [^{18}F] **5**, y se agitó en un agitador de tubos de ensayo durante 10 min. El producto en bruto se purificó por columna de SEC-HPLC semi-preparativa (sistema D, tiempo de retención 10-12 min), y, si fuera necesario, se concentró para inyección con una membrana Amicon de 10 kDa. Tiempo de retención de HPLC (sistema A) 3,3 min; volumen de retención de SEC-HPLC (sistema C) 3,0 ml dando **6**.

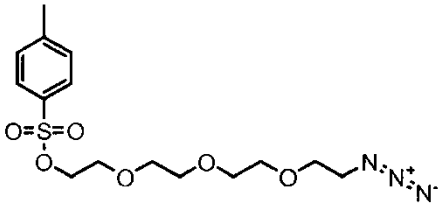
Ejemplo 7 p-toluenosulfonato de 5-azido-3-oxa-pentilo **7**



7

Azida de sodio (0,47 g, 7,24 mmol) añadida a una solución de ditosilato de dietilenglicol (3 g, 7,24 mmol) en DMF (30 ml) y la mezcla resultante se calentó a 110 ºC durante 5 horas. La mezcla de reacción se vertió en agua enfriada (125 ml) y el producto se extrajo con acetato de etilo (3 × 100 ml), los extractos orgánicos recogidos se lavaron con agua (3 × 100 ml), salmuera y se secaron sobre $MgSO_4$. El producto en bruto se purificó sobre SiO_2 y gradiente al 0-100 % de DCM/MeOH como eluyente dando 0,34 g (16 %) de 7 como un aceite incoloro. RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 2,45 (s, 3H), 3,16 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H), 3,60 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H), 3,70 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H), 4,17 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H), 7,35 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 7,81 (d, *J* = 8 Hz, 2H); RMN ^{13}C (100,6 MHz, $CDCl_3$): δ 21,6, 50,6, 68,7, 69,1, 70,2, 128,0, 129,9, 133,0, 144,9; EM-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calc. para $C_{11}H_{15}N_3O_4S$, 286,08; hallado 286,1

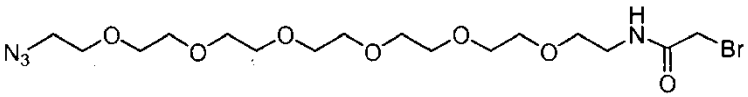
Ejemplo 8 p-toluenosulfonato de 11-azido-3,6,9-trioxa-undecanilo **8**



8

Se hicieron reaccionar azida de sodio y ditosilato de dietilenglicol según el Ejemplo 7 dando 0,7 g (19 %) de **8** como un aceite incoloro. RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 2,44 (s, 3H), 3,38 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 3,55-3,70 (m, 12H), 4,16 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 7,34 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,78 (d, *J*= 8,4 Hz, 2H); RMN ^{13}C (100,6 MHz, $CDCl_3$): δ 21,6, 50,7, 68,7, 68,8, 69,2, 70,0, 70,6-70,7, 127,9, 129,8, 133,1, 144,7 EM-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calc. para $C_{15}H_{24}O_6N_3S$, 374,2; hallado 374,2

Ejemplo 9 N-(20-azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosil)-2-bromoacetamida (**9**, N_3-PEG_6-BA)

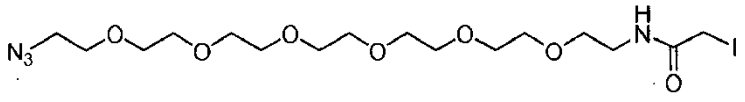


9

Una solución de 20-azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosan-1-amina (NH_2-PEG_6-N_3 (0,5 g, 1,43 mmol) y trietilamina (0,2 ml, 1,43 mmol) en DCM (5 ml) se añadió gota a gota a la solución enfriada (0 ºC) de bromuro de bromoacetilo (0,190 ml, 2,15 mmol) en DCM (10 ml). Se retiró el baño de refrigeración y la mezcla se agitó durante 90 minutos. La solución se vertió en agua con hielo (10 ml) y se extrajo con DCM (2 × 10 ml). Los extractos orgánicos recogidos se lavaron con salmuera (2 × 10 ml) y se secaron sobre $MgSO_4$. El disolvente se evaporó y el producto en bruto se purificó usando cromatografía ultrarrápida sobre SiO_2 y gradiente al 0-100 % de DCM/MeOH como eluyente dando 0,66 g (98 %) de **9** como un aceite amarillo. RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3,39 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H), 3,47-3,51 (m, 2H),

3,60 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 3,63-3,69 (m, 22H), 3,88 (s, 1H), 7,07 (sa, 1H), RMN ^{13}C (100,6 MHz, $CDCl_3$): δ 29,1, 40,0, 50,6, 69,4, 70,0, 70,4, 70,6-70,7, 165,8; EM-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calc. para $C_{16}H_{32}BrO_7N_4$, 471,1, 473,1; hallado 471,0, 473,0

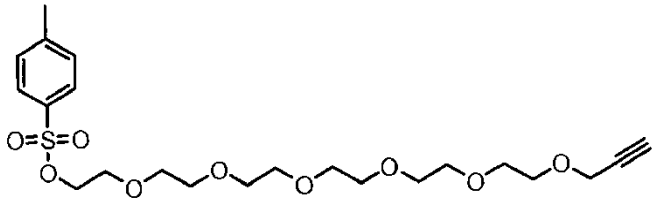
Ejemplo 9a N-(20-azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosil)-2-yodoacetamida (**9a**, N_3-PEG$_6$-IA)



9a

Una solución de 20-azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosan-1-amina (NH_2-PEG$_7$-N_3-, 0,5 g, 1,43 mmol) y yodoacetato de N-succinimidilo (0,4 g, 1,43 mmol) en DCM (5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El disolvente se evaporó y el producto en bruto se purificó usando cromatografía ultrarrápida sobre SiO_2 con un gradiente al 0-100 % de DCM/MeOH dando 0,44 g (60 %) de **9a** como un aceite amarillo; EM-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calc. para $C_{16}H_{32}IO_7N_4$, 519,34; hallado 519,4. RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3,39 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 3,44-3,48 (m, 2H), 3,58 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 3,63-3,69 (m, 22H), 3,74 (s, 2H), 7,10 (sa, 1H). RMN ^{13}C (100,6 MHz, $CDCl_3$): δ 26,0, 40,9, 51,3, 70,0, 70,6-71,3, 168,5 no claro

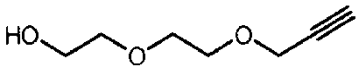
Ejemplo 10 p-toluenosulfonato de 3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicos-20-in-1-ilo (**10,** propargil-PEG$_6$-OTs)



10

Se hicieron reaccionar 3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicos-20-in-1-ol **1** y cloruro de toluenosulfonilo según el Ejemplo 3 dando 0,5 g (47 %) de **10** como aceite incoloro. RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 2,42 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H), 2,45 (s, 3H), 3,58-3,70 (m, 22H), 4,16 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H), 4,20 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H), 7,34 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,80 (d, *J* = 8 Hz, 2H); RMN ^{13}C (100,6 MHz, $CDCl_3$): δ 21,6, 58,4, 68,7, 69,1, 70,4-70,7, 74,5, 79,5, 128,0, 129,8, 133,1, 144,7; EM-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calc. para $C_{22}H_{35}O_9S$, 475,19; hallado 475,2.

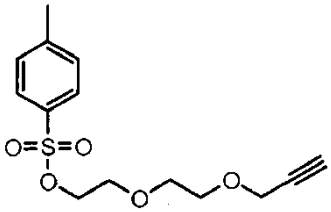
Ejemplo 11 3,6,-dioxanon-8-in-1-ol (**11**, propargil-PEG$_2$-OH)



11

Se hicieron reaccionar dietilenglicol (3,0 g, 28,1 mmol) y bromuro de propargilo según el Ejemplo 1 dando 1,2 g (30 %) de **11** como un aceite incoloro. RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 2,38 (sa, 1H), 2,46 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H), 3,62 (t, *J* = 4Hz, 2H), 3,71-3,75 (m, 6H), 4,22 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H); EM-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calc. para $C_7H_{13}O_3$, 145,08; hallado 145,3.

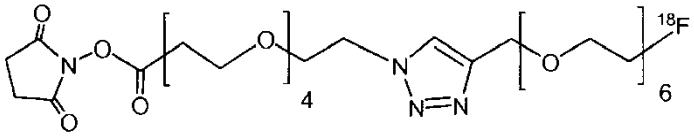
Ejemplo 12 p-toluenosulfonato de 3,6,-dioxanon-8-in-1-ilo (**12**, propargil-PEG$_2$-OTs)



12

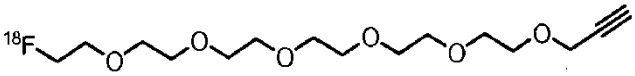
Se hicieron reaccionar 3,6,-dioxanon-8-in-1-ol **11** (1,2 g, 8,3 mmol) y cloruro de toluenosulfonilo según el Ejemplo 3 dando 1,7 g (68 %) de **12** como un aceite incoloro. RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 2,44 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H), 2,45 (s, 3H), 3,60-3,65 (m, 4H), 3,70 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H), 4,15-4,18 (m, 4H), 7,35 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,80 (d, *J* = 8 Hz, 2H); RMN ^{13}C (100,6 MHz, $CDCl_3$): δ 21,6, 58,4, 68,7, 69,0, 69,2, 70,6, 74,6, 79,5, 128,0, 129,8, 133,1, 144,8; EM-ESI (m/z): $[M+H]^+$ calc. para $C_{14}H_{19}O_5S$, 299,09; hallado 299,1.

Ejemplo 13 Síntesis radioquímica de [^{18}F]FPEGNHS **13**



13

Se eluyó [^{18}F]fluoruro del cartucho de T&R en un vial en V de 4 ml usando 10 µl de $TBAHCO_3$ 1,3 M (bicarbonato de tetra-n-butilamonio) en 0,6 ml de acetonitrilo/agua 1:1 (v/v). El agua se eliminó azeotrópicamente por calentamiento en microondas a 60 W, 120 ºC bajo una corriente de argón (600 ccm), seguido de la adición de acetonitrilo anhidro (4 × 0,7 ml). Se añadió p-toluenosulfonato de 3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicos-20-in-1-ilo (propargil-PEG_6-OTs) **10** (2 mg, 4,2 µmol) disuelto en acetonitrilo (0,6 ml) y la mezcla se calentó en microondas en un recipiente cerrado con tabique a 40 W, 120 ºC durante 3 min dando [^{18}F] 1-fluoro-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicos-20-ino:



Se evaporó [^{18}F] 1-fluoro-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicos-20-ino a casi sequedad (no se requirió tratamiento con alúmina), después de que se añadieran 4 mg (10,0 moles) de N_3-PEG_4-NHS (Quanta Biodesign Ltd.) disueltos en acetonitrilo (0,1 ml). A continuación se añadió una mezcla recientemente preparada de $Cu(MeCN)_4PF_6$ (3 mg, 8 µmol), TBTA (4,3 mg, 8 µmol) y 25 µl de 2,6-lutidina en acetonitrilo (0,2 ml). La solución amarilla clara resultante se agitó durante 10 min a temperatura ambiente, se concentró a 100 µl, se diluyó con H_2O con 0,1 % de TFA (1 ml) y se suministró al bucle de HPLC para la purificación. El producto en bruto se purificó por HPLC semipreparativa (sistema B) con un tiempo de retención de 15 min. La fracción recogida se diluyó rápidamente a 20 ml con H_2O, se cargó sobre un cartucho de SPE de 60 mg Phenomenex Strata-X, el producto atrapado sobre el cartucho se aclaró con H_2O (10 ml), se lavó con aire, se eluyó con acetonitrilo (0,5 ml) en un vial en V de 1 ml y se evaporó a 30 ºC a casi sequedad con 600 ccm de argón dando [^{18}F]FPEGNHS **13**.

Ejemplo 14 Marcado directo con ^{18}F de 4D5TioFab modificado por propargilo por CuAAC

Se añadió un exceso de cinco veces de 1-(3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicos-20-in-1-il)-2,5-pirroldiona **2** (0,4 mg, 1 µmol) a 4D5TioFab (10 mg, 0,2 µmol, 5 mg/ml, fosfato de sodio 50 mM a pH 7,2) y se incubó durante 1 hora a 37 ºC. La solución se ajustó a pH 4-5 con 10 % de ácido acético y se purificó por cromatografía de intercambio iónico con cationes sobre una columna HiTrap SP FF (GE Healthcare) con tampón Tris 50 mM a pH 8 con cloruro sódico 100 mM. Una alícuota del 4D5TioFab modificado con propargilo recuperado (100 ug) se añadió a [^{18}F] 23-azido-1-fluoro-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosano **4** seco seguido de la adición de 1,2 mg de BPDS en tampón desgasificado (250 ul de Tris a pH 8) y 0,26 mg de $Cu(MeCN)_4PF_6$ en 20 ul de acetonitrilo. Se excluyó el oxígeno atmosférico del sistema de reacción con argón. Sin embargo, la reacción se desplazó de marrón oscura a incolora durante 10 min, que indica que la reacción se inactivó por oxígeno y que se requieren condiciones de desgasificación más rigurosas.

Ejemplo 15 Modelos animales

Ratones XID atímicos beis de 6-8 semanas de edad se obtuvieron de Harlan Sprague Dawley (Livermore, CA). Tres días antes de la inoculación con células, los ratones se implantaron (s. c., flanco izquierdo) con 0,36 mg de pellas de 17β-estradiol de liberación sostenida de 60 días (Innovative Research of America) para mantener el nivel de estrógenos en suero. Los ratones se inocularon en el panículo adiposo mamario con 5 × 10^6 células BT474M1, un subclon de BT474 (obtenido de California Pacific Medical Center), en 50 % de Matrigel libre de rojo de fenol. El cuidado del animal y el tratamiento siguieron los protocolos autorizados por el Comité institucional para el cuidado y uso de animales de Genentech que está acreditado por la Asociación para la evaluación y acreditación del cuidado de animales de laboratorio (AAALAC)

Ejemplo 16 Formulación y administración de 17-AAG

Se transfirió fosfolípido de huevo (0,5 g) en DCM (5 ml) a un matraz redondo de 500 ml, el disolvente se evaporó y el residuo se almacenó a presión reducida durante 16 horas. Se añadió 5 % (p/v) de solución de dextrosa (25 ml) a los fosfolípidos secos y la mezcla se sonicó durante 60 minutos a temperatura ambiente para obtener emulsión lechosa. Se disolvió 17-AAG (25 mg) en DMSO (1 ml) del que una alícuota (0,25 ml) se mezcló con la emulsión de fosfolípido de huevo (4,8 ml) y se sonicó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La emulsión resultante se administró con 30 minutos de preparación por inyección intraperitoneal en tres dosis de 1 ml (50 mg/kg cada una) durante un periodo de 24 horas como se ha descrito previamente (Smith-Jones et al (2006) J Nucl Med 47:793-6; Smith-Jones et al (2004) Nat Biotechnol 22:701-6). 17-AAG es 17-N-alilamino-17-demetoxigeldanamicina, una sustancia que se estudia en el tratamiento del cáncer, pacientes jóvenes específicos con ciertos tipos de leucemia o tumores sólidos. 17-AAG también se llama: carbamato de [(3*S*,5*S*,6*R*,7*S*,8*E*,10*R*,11*S*,12*E*,14*E*)-21-(alilamino)-6-hidroxi-5,11-

dimetoxi-3,7,9,15-tetrametil-16,20,22-trioxo-17-azabiciclo[16.3.1]docosa-8,12,14,18,21-pentaen-10-ilo] (CAS Reg. No. 75747-14-7).

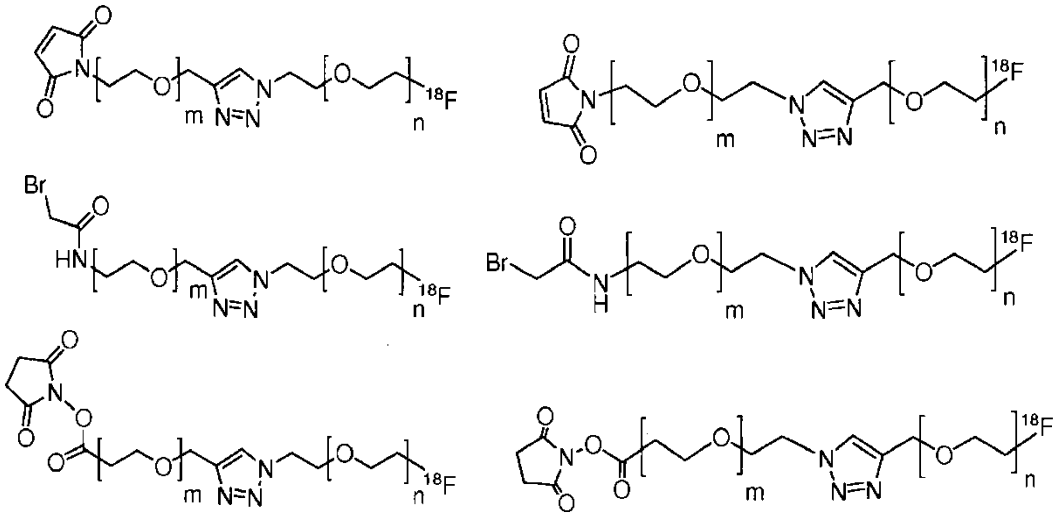
Ejemplo 17 Obtención de imágenes de microTEP

Se anestesiaron ratones con 3 % de sevoflurano y se inocularon i.v. mediante catéter en la vena de la cola con 0,3-0,4 mCi de ^{18}F-Tio4D5Fab en solución isotónica (50-100 µl). Los animales se dejaron recuperar sobre una manta calefactora hasta que se levantaron y entonces se devolvieron a la jaula. Después de 2 horas de captación consciente, los animales se anestesiaron con 3 % de sevoflurano y se colocaron en decúbito prono de cabeza sobre el lecho del escáner. La temperatura corporal se midió por una sonda rectal y se mantuvo por aire caliente. Se adquirieron barridos dinámicos de 60 min. Se obtuvieron reconstrucciones de imágenes del cuerpo completo usando algoritmo de máximo a posteriori (MAP) y se crearon proyecciones de intensidad máxima (MIP) con el software ASIPro (CTI Molecular Imaging). Se usaron imágenes reconstruidas de MAP para obtener niveles de actividad cuantitativa en cada órgano de interés usando el software ASIPro (CTI Molecular Imaging).

Análisis estadístico: Los gráficos se construyeron con el software R versión 2.4.1 (R Foundación for Statistical Computing, Viena, Austria). La significación estadística se determinó usando una prueba de la *t* de Student bilateral y valores de *P* inferiores a 0,05 se consideraron significativos; los datos se presentan como media ± e.e.m., si no se establece de otro modo.

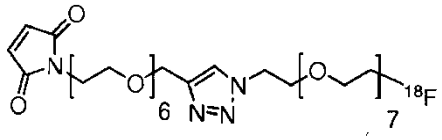
REIVINDICACIONES

1. Un método de marcado de una proteína que comprende hacer reaccionar un reactivo de marcado seleccionado de:

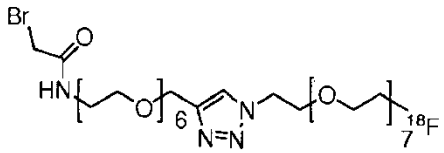


en el que n y m están seleccionados independientemente de un número entero de 2 a 12; y una proteína seleccionada de un anticuerpo, un interferón, una linfocina, una citocina, una hormona o un factor de crecimiento, por lo cual se forma una proteína marcada.

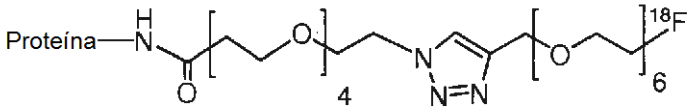
2. El método de marcado de una proteína de la reivindicación 1, en el que el reactivo de marcado es:



o:



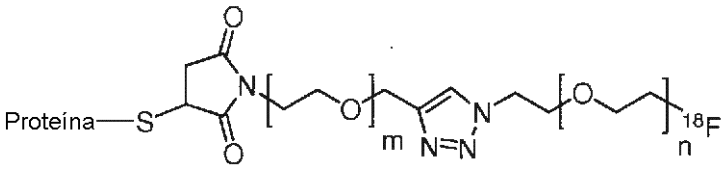
o:

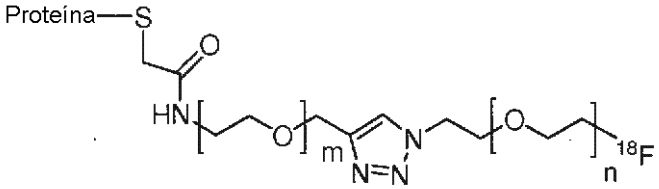


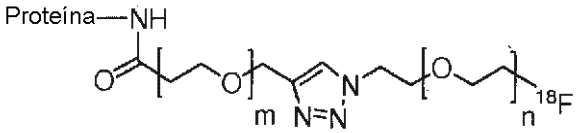
3. El método de marcado de una proteína de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que la proteína comprende un tiol de cisteína libre.

4. El método de marcado de una proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el tiol de cisteína libre de la proteína reacciona con el reactivo de marcado.

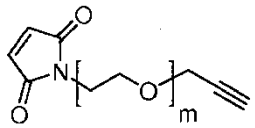
5. Un método de preparación de una proteína marcada seleccionada de:

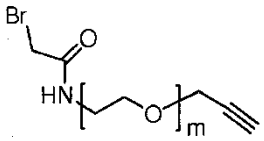


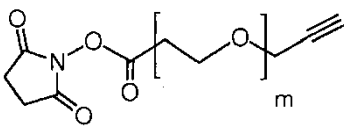




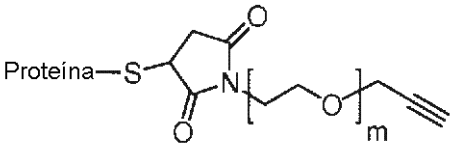
que comprende hacer reaccionar un reactivo de alquino seleccionado de:

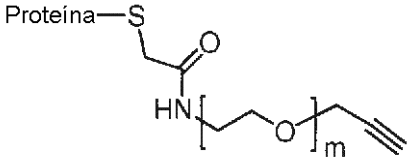


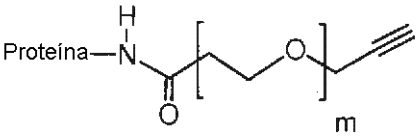




con una proteína seleccionada de un anticuerpo, un interferón, una linfocina, una citocina, una hormona o un factor de crecimiento, para formar una alquino-proteína seleccionada de:

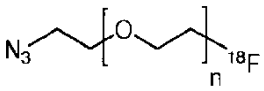






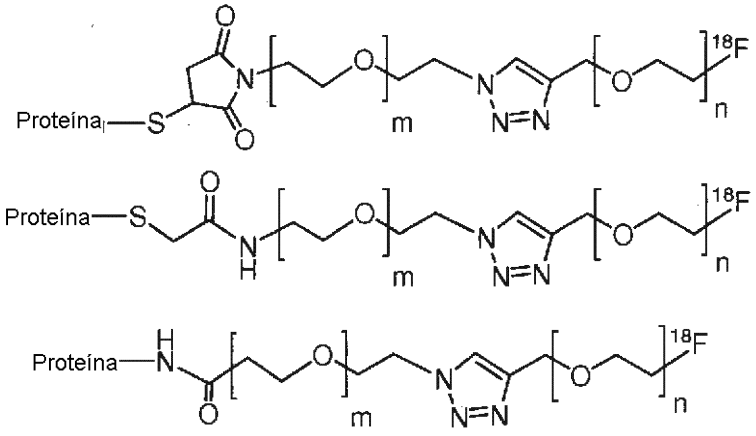
;

y hacer reaccionar la alquino-proteína con un reactivo de ^{18}F-PEG-azida que tiene la fórmula:

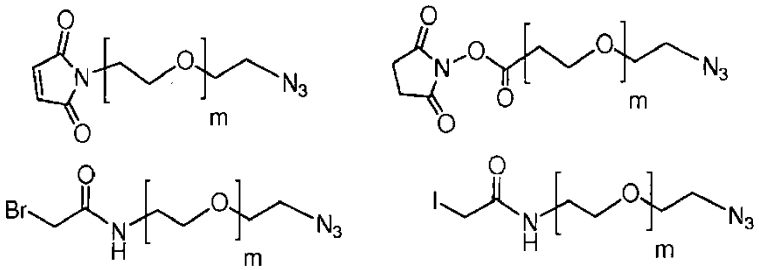


en presencia de un catalizador de cobre,
en la que n y m están seleccionados independientemente de un número entero de 2 a 12; por lo que se forma la proteína marcada.

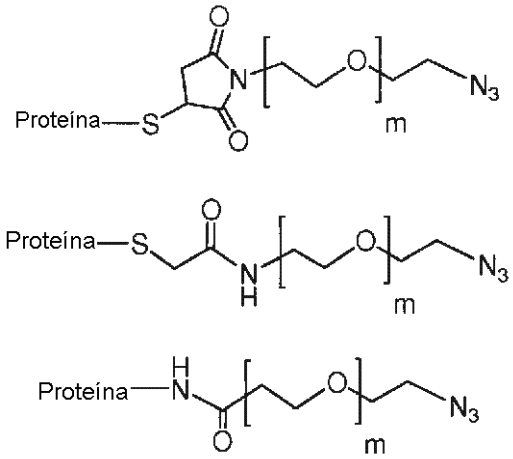
6. Un método de preparación de una proteína marcada seleccionada de:



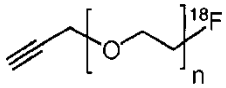
que comprende hacer reaccionar un reactivo de azida seleccionado de:



con una proteína seleccionada de un anticuerpo, un interferón, una linfocina, una citocina, una hormona o un factor de crecimiento, para formar una azido-proteína seleccionada de:



y hacer reaccionar la azido-proteína con un reactivo de ^{18}F-PEG-alquino que tiene la fórmula:



en presencia de un catalizador de cobre,
en las que n y m están seleccionados independientemente de un número entero de 2 a 12;
por lo que se forma la proteína marcada.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína es un anticuerpo seleccionado de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo murino, un anticuerpo

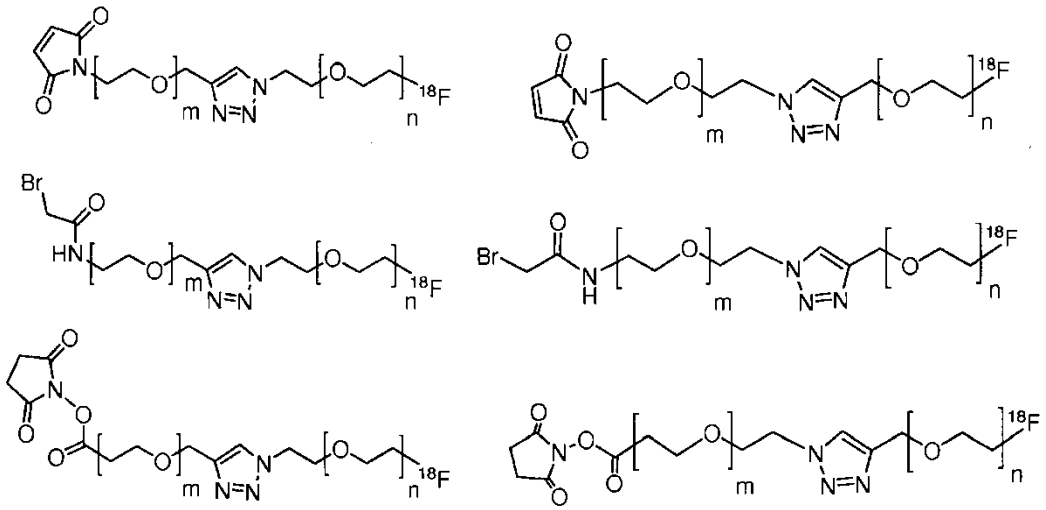
quimérico, un anticuerpo humano y un anticuerpo humanizado.

8. El método de la reivindicación 7, en el que el anticuerpo es un fragmento Fab.

9. El método de la reivindicación 8, en el que el fragmento Fab es 4D5TioFab.

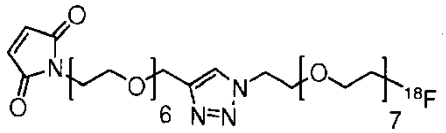
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el catalizador de cobre es $Cu(MeCN)_4PF_6$ o $CuSO_4$.

11. Un reactivo de marcado seleccionado de:

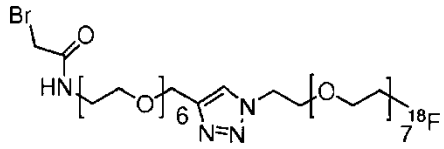


en las que n y m están seleccionados independientemente de un número entero de 2 a 12.

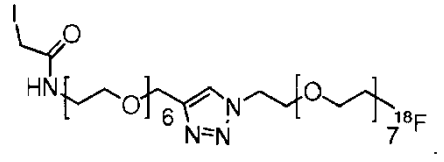
12. El reactivo de marcado de la reivindicación 11 que tiene la fórmula:



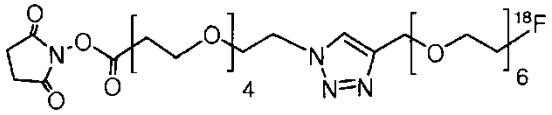
o:



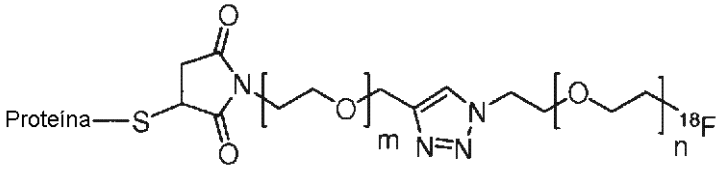
o

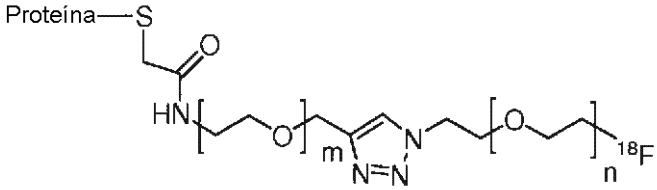


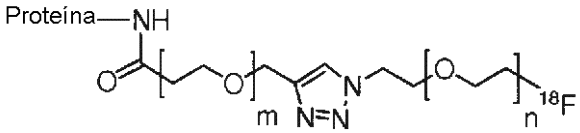
o:

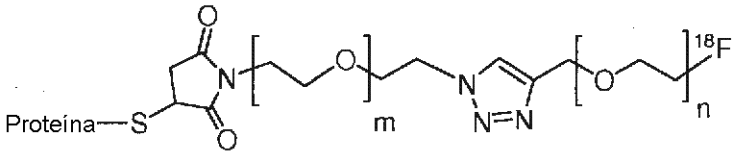


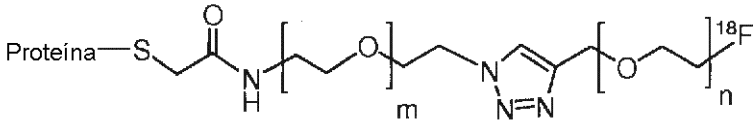
13. Una proteína marcada seleccionada de:

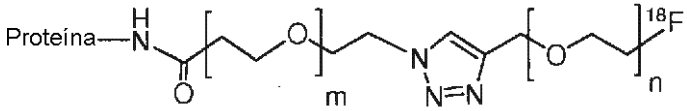






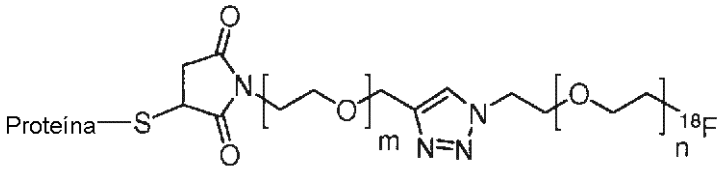


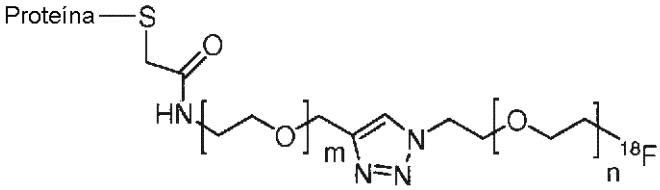


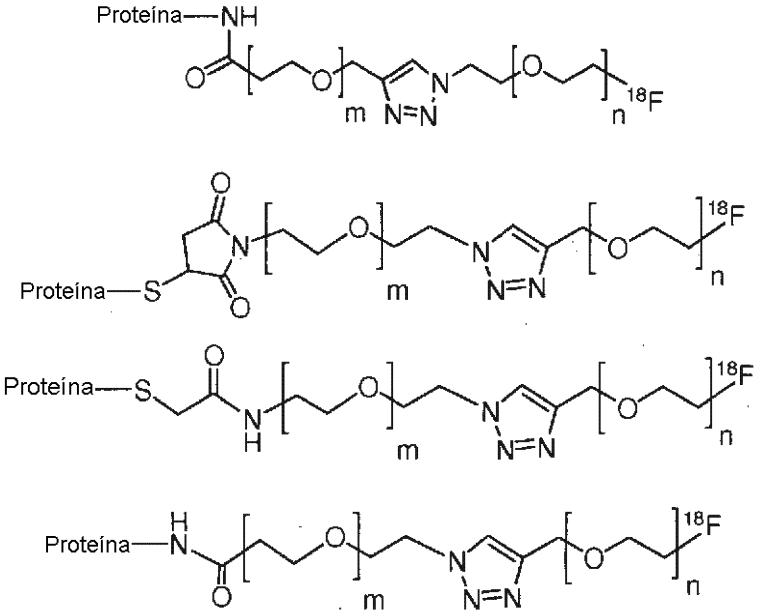


en las que n y m están seleccionados independientemente de un número entero de 2 a 12; y la proteína está seleccionada de un anticuerpo, un interferón, una linfocina, una citocina, una hormona y un factor de crecimiento.

14. Una composición farmacéutica que comprende una proteína marcada y uno o más vehículos, deslizantes, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables,
en la que la proteína marcada está seleccionada de



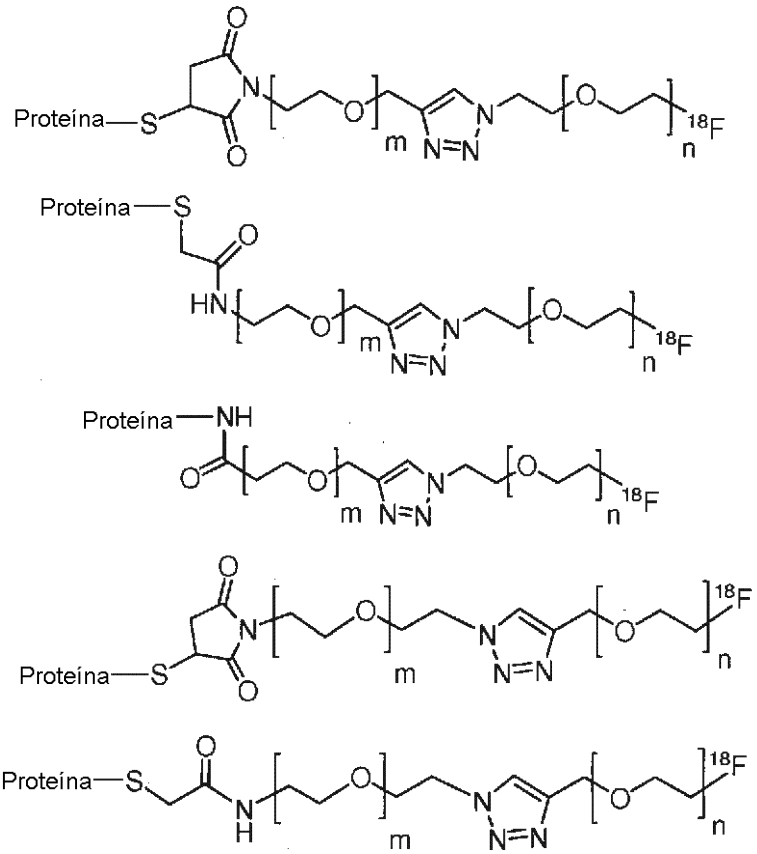


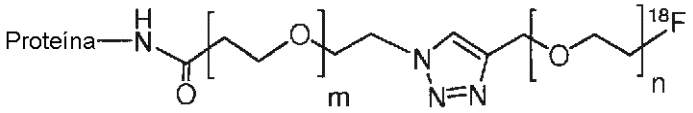


en las que n y m están seleccionados independientemente de un número entero de 2 a 12; y la proteína está seleccionada de un anticuerpo, un interferón, una linfocina, una citocina, una hormona y un factor de crecimiento.

15. Un método de obtención de imágenes que comprende:

administrar la proteína marcada a un animal; y
detectar *in vivo* la presencia de la proteína marcada por obtención de imágenes,
en el que la proteína marcada está seleccionada de:

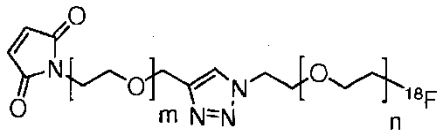




en las que n y m están seleccionados independientemente de un número entero de 2 a 12; y la proteína está seleccionada de un anticuerpo, un interferón, una linfocina, una citocina, una hormona y un factor de crecimiento.

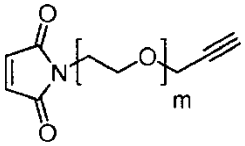
16. El método de la reivindicación 15, en el que la proteína marcada se une al antígeno y/o el animal es un modelo de ratón de xenoinjerto de tumor.

17. Un proceso de preparación de un reactivo de marcado que tiene la fórmula:

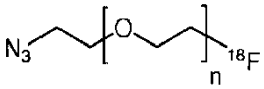


en la que:

n y m están seleccionados independientemente de un número entero de 2 a 12.
que comprende hacer reaccionar un reactivo de maleimida-PEG-alquino que tiene la fórmula:



con un reactivo de ^{18}F-PEG-azida que tiene la fórmula:



en presencia de un catalizador de cobre,
en la que n y m están seleccionados independientemente de un número entero de 2 a 12, por lo que se forma el reactivo de marcado.

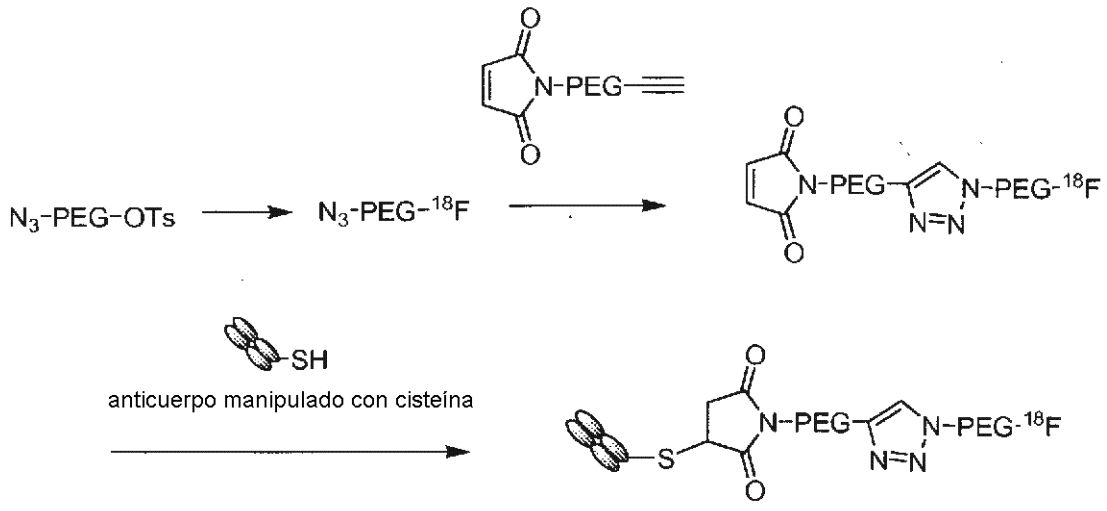


Figura 1

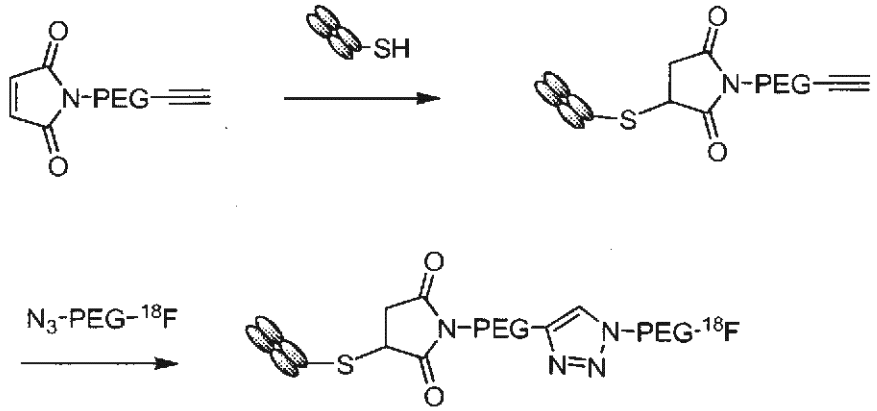


Figura 2

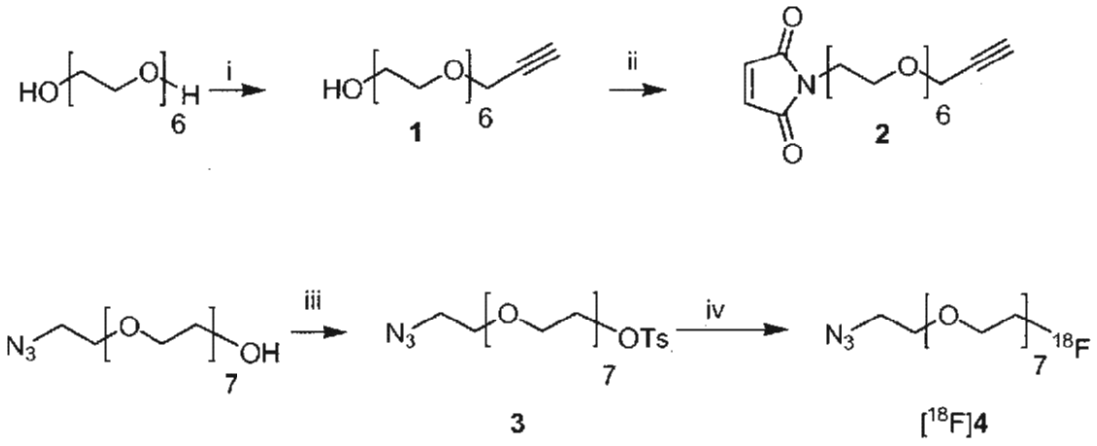


Figura 3

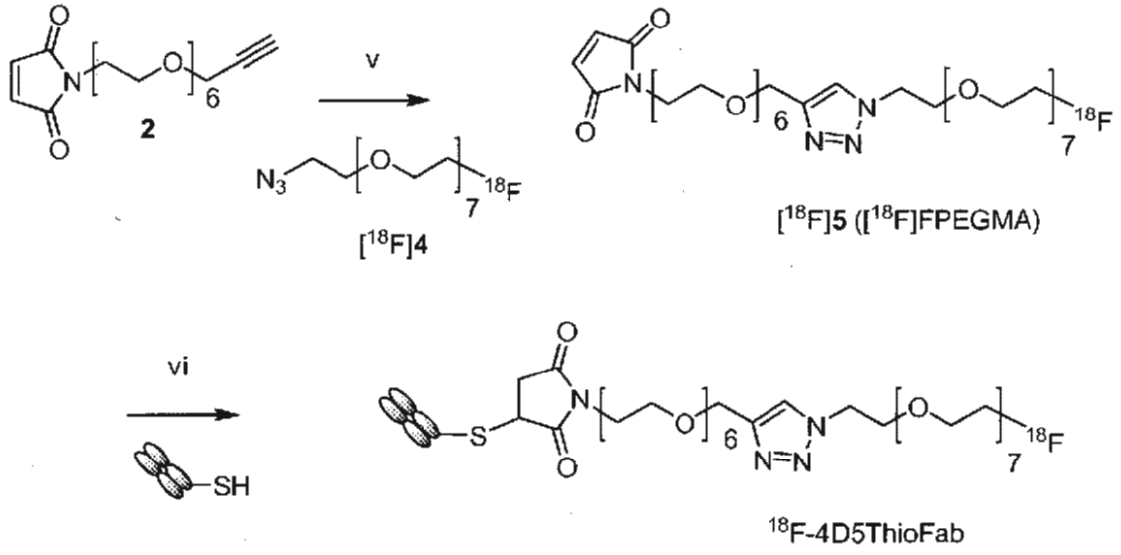


Figura 4

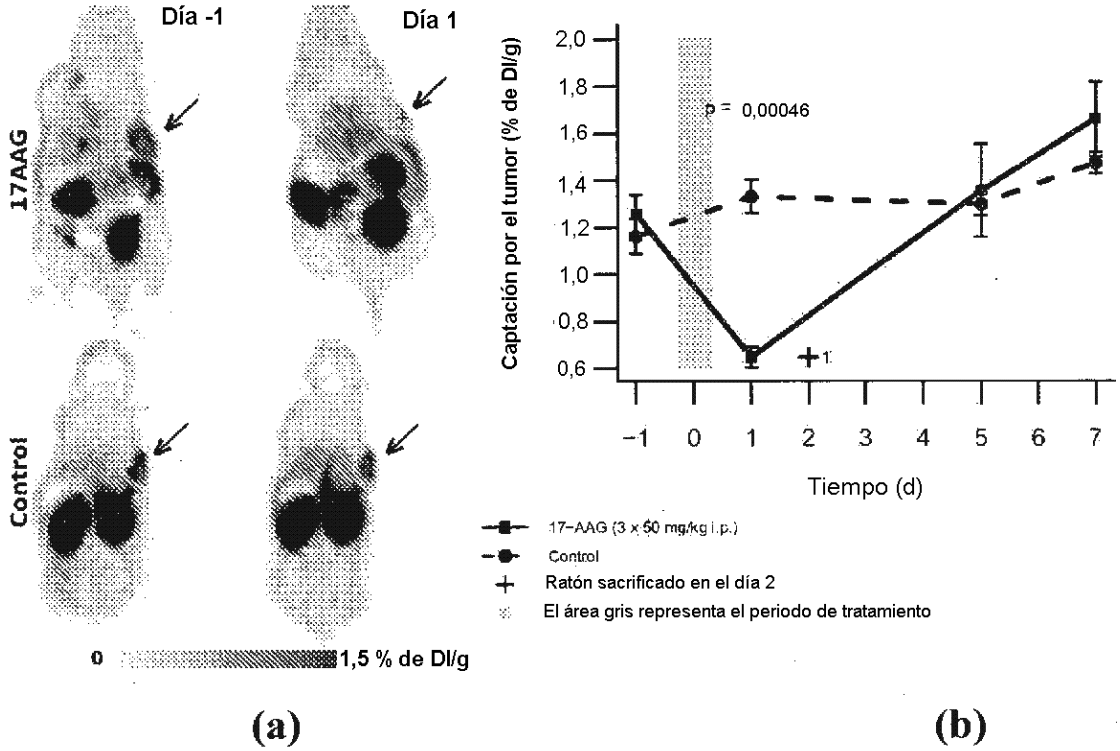

Día -1
Día 1
17AAG
Control
0
1,5 % de DI/g
(a)
Captación por el tumor (% de DI/g)
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
p = 0,00046
−1
0
1
2
3
4
5
6
7
Tiempo (d)
17-AAG (3 x 50 mg/kg i.p.)
Control
Ratón sacrificado en el día 2
El área gris representa el periodo de tratamiento
(b)

Figura 5