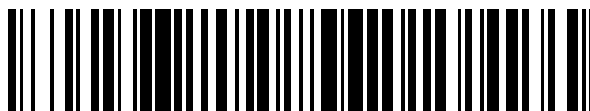


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 829**

51 Int. Cl.:

**A61K 51/08** (2006.01)

**A61K 51/10** (2006.01)

**A61K 51/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.11.2011 PCT/GB2011/001599**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2012 WO12063028**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2011 E 11788554 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2637705**

54 Título: **Conjugados y sus usos en la obtención de imágenes moleculares**

30 Prioridad:

**11.11.2010 GB 201019118**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.07.2017**

73 Titular/es:

**KING'S COLLEGE LONDON (100.0%)  
Strand, London WC2R 2LS, GB**

72 Inventor/es:

**BALLINGER, JAMES RUSSELL;  
BERRY, DAVID;  
BLOWER, PHILIP JOHN y  
MA, YONGMIN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 625 829 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

Conjugados y sus usos en la obtención de imágenes moleculares

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos bifuncionales, y en particular, a compuestos para su uso en la obtención de imágenes moleculares y terapia.

10 Los compuestos pueden conjugarse en un grupo de direccionamiento, de modo que los compuestos se dirigen a las células o tejidos específicos en un sujeto.

**Antecedentes de la invención**

15 La obtención de imágenes moleculares puede definirse como la cartografía tridimensional de procesos moleculares *in vivo*, tales como la expresión génica, el flujo sanguíneo, los cambios fisiológicos (pH, [O<sub>2</sub>], etc.), respuestas inmunitarias, y tránsito celular. Puede usarse para detectar y diagnosticar una enfermedad, seleccionar los tratamientos óptimos y monitorizar los efectos de los tratamientos para obtener una lectura inicial de eficacia. En principio, se pueden usar un número de diferentes tecnologías para la obtención de imágenes moleculares, entre las  
20 que se incluyen la tomografía por emisión de positrones (TEP), la tomografía por emisión de fotón único (TEFU), y la obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) u ópticas (IO). Están surgiendo combinaciones de estas modalidades para proporcionar aplicaciones clínicas mejoradas, por ejemplo, TEP/TC y TEFU/TC ("obtención de imágenes multimodal").

25 La obtención de imágenes por radionúclidos con TEP y TEFU tiene la ventaja de caracterizarse por una sensibilidad extremadamente alta y por la administración de pequeñas cantidades de agentes de contraste (por ejemplo, picomoles *in vivo*), que no perturban los procesos moleculares *in vivo*. Además, los principios de direccionamiento para la obtención de imágenes por radionúclidos pueden aplicarse también en el suministro dirigido de la terapia por radionúclidos. Normalmente el isótopo que se usa como radionúclido en la obtención de imágenes moleculares se  
30 incorpora a una molécula para producir un radiomarcador que es farmacéuticamente aceptable para el sujeto. Se han desarrollado varios radiomarcadores con un abanico de propiedades. Por ejemplo, la fluorodesoxiglucosa (<sup>18</sup>F) es un derivado de glucosa marcado que se usa frecuentemente en la obtención de imágenes moleculares con TEP.

El documento WO 2009/021947 describe quelantes tripodales para su uso como agentes de contraste de las IRM.  
35 Se describen los grupos quelantes de la hidroxipiridinona con un grupo R hidrófilo. El grupo hidrófilo se requiere para ayudar a disolver el quelante. Además, el quelante puede acoplarse a moléculas más grandes, tales como un dendrímero, para aumentar la relatividad del agente de contraste de las IRM. Ferguson *et al.*, *Microbes and Infection* 12 (2010) 287-294, describen un quelante de hierro hexadentado para su uso en la restricción del crecimiento de los intramacrófagos de la *Mycobacterium avium*.

40 Chaves *et al.*, *Journal of Inorganic Biochemistry* 105 (2011) 31-38, describen un complejo de galio con una trihidroxipiridinona tripodal para la obtención de imágenes diagnósticas nucleares potenciales. Santos, *Coordination Chemistry Reviews* 252 (2008) 1213-1224 describe los desarrollos recientes en la aplicación clínica de las 3-hidroxi-4-piridinonas. Burgess y Rangel, *Advances in Inorganic Chemistry* 60 (2008) 167-243, describen las hidroxipiridinonas, las hidroxipiridinonas, y sus complejos.

45 Zhou *et al.*, *J. Med. Chem* 49 (2006) 4171-4182 describen los dendrímeros de unión al hierro para su uso en el tratamiento de la hemocromatosis.

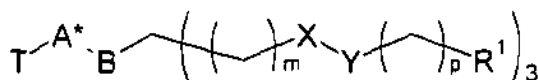
**Sumario de la invención**

50 Puede ser complicado preparar radiomarcadores con restos funcionales sensibles. Por ejemplo, la incorporación de radioisótopos al radiomarcador puede implicar la producción de temperaturas elevadas que alterarían la estructura proteínica. Puede ser deseable incluir restos funcionales sensibles en los radiomarcadores, de modo que existe una necesidad de proporcionar radiomarcadores que puedan prepararse en condiciones moderadas. Como resultado, pueden producirse conjugados de obtención de imágenes con una funcionalidad mejorada y con propiedades de  
55 obtención de imágenes moleculares también mejoradas.

Actualmente, el 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-ácido tetraacético (DOTA) es un quelante habitual del galio-68 (y de otros radioisótopos metálicos, tales como el Ga-67, In-111, Cu-64, Lu-177, Y-90) usados en la obtención de imágenes moleculares y en la terapia por radionúclidos dirigida. Sin embargo, DOTA tiene un amplio  
60 tiempo de radiomarcaje de en torno a 30 minutos (relativo a la semivida del <sup>68</sup>Ga ~ 68 minutos). Además, la quelación del galio mediante derivados de DOTA suele requerir una alta temperatura de marcaje de aproximadamente 95 °C. Los presentes inventores han hallado moléculas bifuncionales que son capaces de quelar rápidamente radionúclidos a temperatura ambiente, conservando al mismo tiempo una estabilidad adecuada o incluso mejorada hacia la disociación en el medio biológico. Además de la parte quelante metálica, las moléculas  
65 bifuncionales tienen una parte reactiva que acopla la molécula bifuncional a un resto funcional, tal como el grupo de direccionamiento que puede dirigirse hacia, por ejemplo, las células, tejidos o moléculas biológicas del cuerpo.

En su versión más general, la presente invención proporciona moléculas bifuncionales para la obtención de imágenes moleculares que tienen una parte quelante tris(hidroxipiridinona) hexadentada tripodal que se acopla a un radionúclido o una marca de imagen y una funcionalidad reactiva que se acoplan a un grupo de direccionamiento o a un vehículo de suministro para suministrar un fármaco, toxina u otra molécula, de modo que la distribución *in vivo* y/o la ubicación final del grupo de direccionamiento o del vehículo de suministro pueden monitorizarse.

En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto bifuncional para su uso en un método *in vivo* de obtención de imágenes de diagnóstico molecular en el que el compuesto bifuncional se representa por la fórmula:

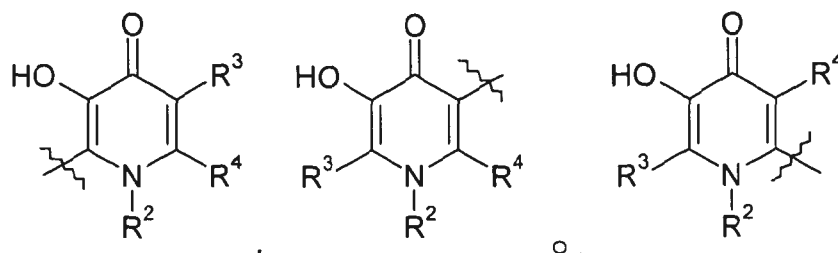


o sales del mismo;

en la que uno de X e Y es C=O y la otra es NR;

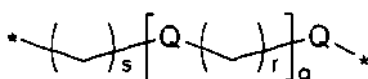
en la que cada m y p se seleccionan independientemente de 0 a 6;

en la que R<sup>1</sup> es un grupo quelante capaz de quelar un radionúclido y se selecciona entre:



en la que R, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1-7</sub> opcionalmente sustituido;

B es un grupo enlazador para enlazar el grupo quelante con el grupo reactivo, en el que se representa por la fórmula:



en la que Q se selecciona independientemente entre un grupo que consiste en -NR<sup>5</sup>-, -C(O)NR<sup>5</sup>-, -C(O)O-, -NR<sup>5</sup>C(O)NR<sup>5</sup>-, -NR<sup>5</sup>C(S)NR<sup>5</sup>- y -O-, cada R<sup>5</sup> es independientemente hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1-7</sub> opcionalmente sustituido, cada q y s se seleccionan independientemente de 0 a 6 y cada r se selecciona independientemente de 1 a 6;

A\* es un grupo reactivo reaccionado que se acopla a T, siendo T un grupo diana capaz de unirse a una diana de interés en el sujeto;

en el que el método comprende las etapas de:

- (a) administrar el compuesto bifuncional al sujeto para que el compuesto bifuncional se una a la diana de interés;
- y
- (b) administrar además una composición de sonda de obtención de imágenes que comprende un radionúclido al sujeto, de manera que el grupo quelante R<sup>1</sup> del compuesto bifuncional quelate el radionúclido en la diana de interés; y
- (c) detectar el radionúclido para la imagen de la diana de interés en el sistema biológico.

El compuesto bifuncional del primer aspecto puede hacer circular el sistema biológico a una ubicación dirigida. Después, cuando el radionúclido se introduce en el sujeto, el radionúclido puede pasar rápidamente a través del sistema y quelar con el compuesto bifuncional. De este modo, el radionúclido puede fijarse en un lugar de interés

dentro de un corto espacio de tiempo de ser introducido en el sistema biológico de manera que se maximice la eficacia del radionúclido.

5 La presente invención también proporciona una molécula bifuncional para su uso en un método *in vivo* de diagnóstico por imagen molecular, la molécula bifuncional comprende un compuesto bifuncional como se ha definido anteriormente y un radionúclido unido a través de un grupo quelante del compuesto bifuncional; y el método comprende las etapas de:

- 10 (a) administrar a la molécula bifuncional al sujeto para que el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional se una a la diana de interés; y  
 (b) detectar el radionúclido para la imagen de la diana de interés en el sistema biológico.

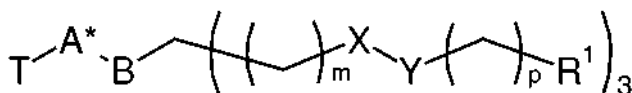
Preferentemente s se selecciona independientemente de 0 a 6, cada r se selecciona independientemente de 1 a 6 y q se selecciona de 1 a 6.

15

Preferentemente el método de obtención de imágenes moleculares es PET o SPET.

La presente invención también proporciona un compuesto bifuncional o molécula bifuncional para uso en un método de terapia con radionúclidos, en el que el compuesto bifuncional se representa por la fórmula:

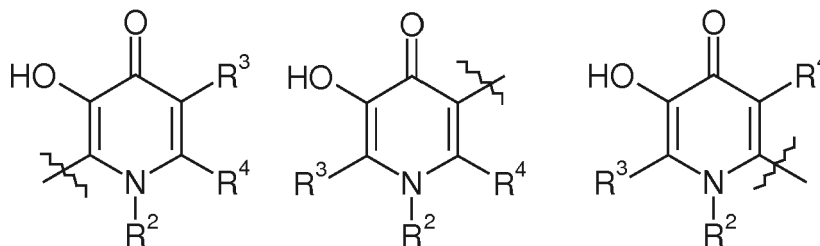
20



o sales del mismo;

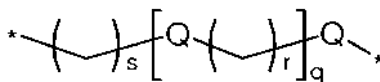
25

- en la que uno de X e Y es C=O y la otra es NR;  
 en la que cada m y p se seleccionan independientemente de 0 a 6;  
 en la que R<sup>1</sup> es un grupo quelante capaz de quelar un radionúclido y se selecciona entre:



30

en la que R, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1-7</sub> opcionalmente sustituido; B es un grupo enlazador para enlazar el grupo quelante con el grupo reactivo, y se representa por la fórmula:



35

en la que Q se selecciona independientemente entre un grupo que consiste en -NR<sup>5</sup>-, -C(O)NR<sup>5</sup>-, -C(O)O-, -NR<sup>5</sup>C(O)NR<sup>5</sup>-, -NR<sup>5</sup>C(S)NR<sup>5</sup>- y -O-, cada R<sup>5</sup> es independientemente hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1-7</sub> opcionalmente sustituido, cada q y s se seleccionan independientemente de 0 a 6 y cada r se selecciona independientemente de 1 a 6;

40

A\* es un grupo reactivo reaccionado que se acopla a T, siendo T un grupo diana capaz de unirse a una diana de interés en el sujeto;

y en el que la molécula bifuncional comprende un compuesto bifuncional como se ha definido anteriormente y un radionúclido capaz de suministrar radioterapia a la diana de interés y unido a través de un grupo quelante del compuesto bifuncional;

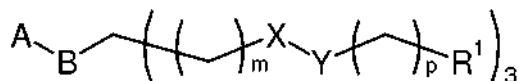
45

y el método comprende las etapas de:

- (a) administrar el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional al sujeto para que el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional se una a la diana de interés; y  
 50 (b) en el que se ha administrado un compuesto bifuncional, administrar además una composición al sujeto, la composición que comprende un radionúclido capaz de administrar radioterapia al blanco de interés, de manera que el grupo quelante R<sup>1</sup> del compuesto bifuncional quelate el radionúclido en la diana de interés.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un precursor de compuesto bifuncional, un compuesto bifuncional o una molécula bifuncional, en el que:

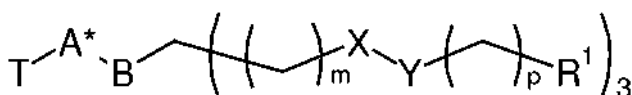
- 5 (a) el precursor del compuesto bifuncional se representa por la fórmula:



- 10 o sales del mismo;  
En la que:

- (i) X es NR e Y es C=O, m se selecciona de 0 a 6, y p se selecciona de 1 a 6; o  
(ii) Y es NR y X es C=O, y m y p se seleccionan independientemente de 0 a 6;

- 15 en el que R<sup>1</sup> y B son como se han definido anteriormente;  
A es un grupo reactivo para acoplamiento a un grupo diana capaz de unirse a una diana de interés en el sujeto;  
(b) el compuesto bifuncional se representa por la fórmula:

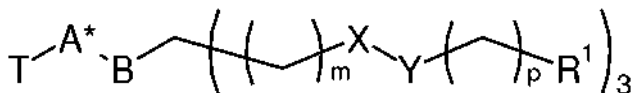


- 20 o sales del mismo;  
En la que:

- 25 (i) X es C=O e Y es NR, m se selecciona de 0 a 6, y p se selecciona de 1 a 6; o  
(ii) Y es NR y X es C=O, y m y p se seleccionan independientemente de 0 a 6;

en la que R<sup>1</sup>, B y A\* son como se han definido anteriormente; y

- 30 (c) la molécula bifuncional comprende un compuesto bifuncional y un radionúclido unido a través de un grupo quelante del compuesto bifuncional, en el que el compuesto bifuncional de la molécula bifuncional se representa por la fórmula:



- 35 o sales del mismo;

en la que uno de X e Y es C=O y la otra es NR;  
en la que cada m y p se seleccionan independientemente de 0 a 6;  
en la que R<sup>1</sup>, B, A\* y T son como se han definido anteriormente.

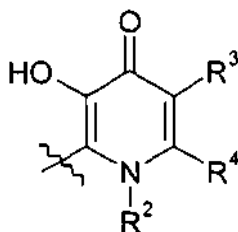
- 40 A es un grupo reactivo para el acoplamiento a un resto biológico, un grupo diana, una proteína, un polipéptido o un vehículo de suministro.

Los compuestos conjugados bifuncionales proporcionan una porción quelatante de tris(hidroxipiridinona)hexadentada tripodal que es capaz de quelar radionúclidos metálicos en un tiempo muy corto (del orden de 5 min o menos) y es capaz de hacerlo a temperatura ambiente en agua alrededor de las concentraciones fisiológicas PH. La porción reactiva se une a la porción quelante y permite que la molécula bifuncional se conjugue con un grupo diana u otro vehículo, tales como un polipéptido u otro vehículo, fármaco o nanopartícula. El marcaje de temperatura rápida y baja del grupo quelante permite que la molécula bifuncional se acople tanto a un radionúclido con una vida media corta, tal como <sup>68</sup>Ga (T<sup>1/2</sup> = 68 minutos) a través de la porción quelante y a un grupo diana sensible a la temperatura, tal como un polipéptido que puede desnaturizarse a temperaturas de radiomarcaje superiores a la temperatura del cuerpo.

La eficacia de la reacción de quelación también permite el marcaje a una concentración de vehículo de suministro muy baja. De este modo, una proporción significativa del vehículo de administración se marca radiactivamente con el radionúclido y, como resultado, conduce a una actividad específica muy alta. De este modo, la molécula bifuncional proporciona un excelente precursor para un conjugado de radiomarcaje.

Preferentemente el grupo reactivo A es el grupo funcional reactivo con proteínas. El grupo reactivo con proteínas puede reaccionar con proteínas o péptidos modificados u otros vehículos derivatizados para este fin. Preferentemente el grupo reactivo con la proteína es un grupo maleimida, un aldehído, un éster, o un reactivo "click", tal como un grupo alquino, azida, alqueno, hidrazina, derivado de hidrazina, alcoxiamina, derivado de alcoxiamina, aminoxi o tiol. Los grupos maleimida, aldehído y éster reaccionan eficazmente con residuos peptídicos que contienen tiol o amina (cisteína, lisina) y así se puede formar fácilmente un conjugado. Otros grupos funcionales bio-ortogonales pueden manipularse en péptidos y proteínas con el propósito de conjugarlos con grupos alquino, azida, alqueno, hidrazina, aminoxi o tiol.

10 Preferentemente R<sup>1</sup> es

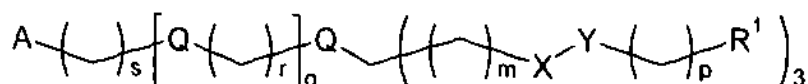


15 Preferentemente R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son independientemente H o CH<sub>3</sub>. Se prefiere tener sustituyentes relativamente pequeños en el anillo heterocíclico de manera que los sustituyentes no obstaculicen estéricamente el sitio de quelación del grupo quelante y de manera que el quelante no se vuelva demasiado lipófilo. Así en realizaciones preferidas, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son H. Sin embargo, uno o más sustituyentes metilo en el grupo heterocíclico pueden usarse para adaptar la solubilidad y/o la hidrofobicidad de la molécula. Por consiguiente uno o más de R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> pueden ser CH<sub>3</sub>.

20 Preferentemente m es 2 o 3. Preferentemente p es 0 o 1. Más preferentemente cuando m es 2, p es 1 o cuando m es 3, p es 0. Esto da una longitud de brazo tripodal al grupo quelante R<sub>1</sub> de 5 átomos (m + p = 3 más X e Y). Cuando la longitud del brazo es de 5 átomos, el grupo tripodal es adecuado para quelar radionúclidos, tal como galio.

25 El grupo enlazador B conecta la porción quelante tripodal y la funcionalidad reactiva (y por ejemplo el grupo de orientación o vehículo portador cuando se conjuga). El grupo enlazante puede adaptarse variando los grupos Q, q, r y/o s para variar, por ejemplo, la longitud del enlazador.

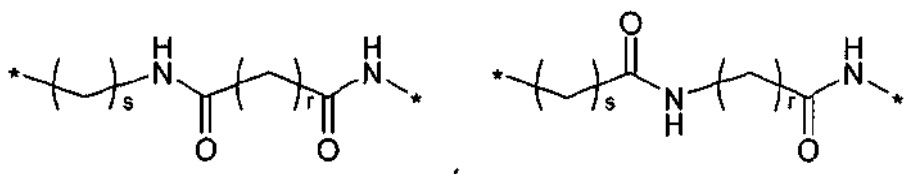
30 El grupo enlazador puede estar dispuesto en cualquier dirección de manera que A o el carbono cuaternario (unido a cada brazo que tiene un grupo quelante) o ambos pueden unirse a Q. En realizaciones preferidas, B está dispuesto de manera que el compuesto bifuncional se representa por la fórmula:

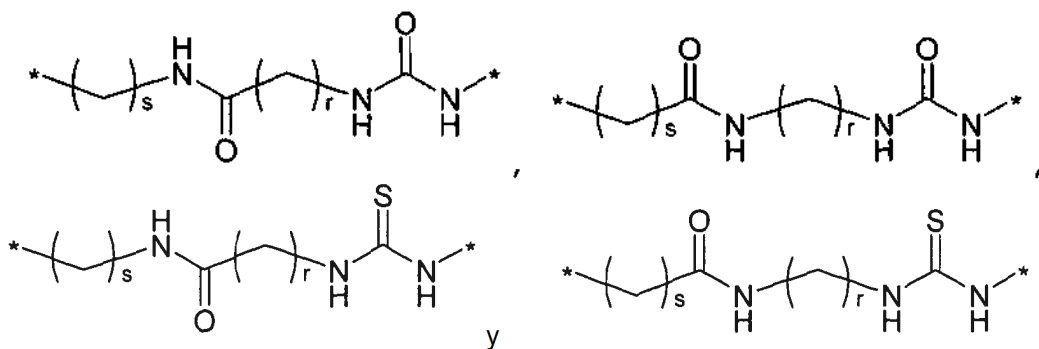


35 El ordenamiento de los átomos en el grupo funcional representado por Q no está limitado. En otras palabras, cuando Q es un grupo amida, el orden del grupo desde la porción quelante hacia la funcionalidad reactiva puede ser -NR<sup>5</sup>- después -C(O)- o viceversa.

40 Preferentemente al menos una Q es una amida (-C(O)NR<sup>5</sup>-). Preferentemente q es 1, r es 2 y/o s es 1. Más preferentemente q es 1, r es 2 y s es 1. Preferentemente R<sup>5</sup> es hidrógeno.

Preferentemente B se representa por una de las siguientes fórmulas:

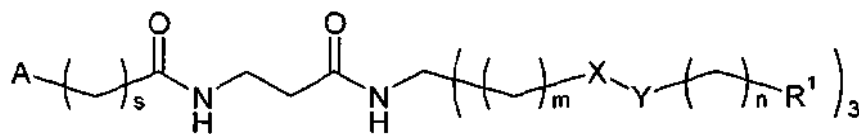




en las que  $r$  se selecciona de 1 a 6 y  $s$  se selecciona de 0 a 6. Preferentemente  $r$  es 2 y/o  $s$  es 2.

5

En realizaciones preferidas, el compuesto bifuncional se representa por la siguiente fórmula:



10 en la que  $A$ ,  $s$ ,  $m$ ,  $X$ ,  $Y$ ,  $n$  y  $R^1$  son como se definen en el presente documento.

En realizaciones preferidas, el radionúclido es un isótopo de tecnécio, renio, cobre, cobalto, galio, itrio, lutecio u otro lantánido, indio, circonio, escandio. Más preferentemente el radionúclido es Tc-99m, Re-186, Re-188, Co-57, In-111, Cu-60, Cu-61, Cu-62, Cu-64, Cu-67, Tc-94m, Ga-68, Ga-67, Ga-66, Y-90, Y-86, Sc-44, Sc-47, Fe-52, Sn-117m, Tb-149, Gd-153, Ho-166, Lu-177, Zr-89, Bi-213 o Co-55 y preferentemente el radionúclido es galio y lo más preferentemente Ga-68 o Ga-67.

15

Preferentemente, el grupo de direccionamiento es un miembro de un par de unión específico que es capaz de unirse a un compañero de unión en la diana de interés. Más preferentemente, el grupo de direccionamiento y la diana de interés son un receptor y un ligando, o un anticuerpo y un antígeno, o una sonda metabólica, por ejemplo, transportador de glucosa/glucosa, hipoxia/resto responsable de la hipoxia, o mineral óseo/bifosfonato o avidina (o estreptavidina o una proteína relacionada) y biotina (o un derivado de la biotina), o ARN y ARN antisentido.

20

Preferentemente, el grupo de direccionamiento es un péptido, una proteína, un anticuerpo, aptámero o ligando de molécula pequeña que es capaz de unirse a un compañero de unión en la diana de interés. Más preferentemente, el grupo de direccionamiento es un polipéptido capaz de unirse a la fosfatidilserina (PS), de modo que puede emplearse la composición de conjugado bifuncional en los estudios de obtención de imágenes de la apoptosis o muerte celular. Más preferentemente, el grupo de direccionamiento incluye anexina V y el dominio C2 de una sinaptotagmina, un péptido de TIMP-2, CEA, RGD, un péptido de direccionamiento al receptor de la somatostatina, bombesina, gastrina o un péptido de direccionamiento a VCAM.

25

30

Preferentemente, la diana de interés es una diana molecular *in vivo*. Más preferentemente, la diana de interés es un ligando o receptor expresado en células o tejido enfermos (cuya abundancia u ocupación del ligando ha de determinarse), un antígeno de superficie celular asociado a un estado patológico, marcadores tumorales, tales como el marcador específico del cáncer o un marcador específico de tejido o un marcador de un proceso normal que está regulado al alza o a la baja en un estado patológico. Preferentemente, la diana de interés es una ubicación, un órgano, un tipo de tejido o propiedad fisiológica en un sujeto que se somete a la obtención de imágenes moleculares.

35

El grupo  $A$  reactivo puede estar presente para acoplarse a un vehículo de suministro. Un vehículo de suministro, tal y como se define en el presente documento, es una estructura molecular que porta una molécula funcional, tal como un fármaco de molécula pequeña o toxina con el fin de suministrar la molécula funcional, por ejemplo, a un sistema biológico. La molécula funcional puede estar contenida en el interior de o unida a una superficie del vehículo de suministro. La molécula funcional normalmente está asociada de manera reversible al vehículo de suministro, de modo que la molécula funcional puede liberarse en una ubicación determinada en el sistema biológico. Muchos de estos vehículos de suministro se conocen en la materia. Preferentemente, el vehículo de suministro es una nanopartícula o liposoma. Las moléculas funcionales, tales como las sustancias farmacéuticas, pueden estar unidas a la superficie de las nanopartículas o estar contenidas en el interior de los liposomas.

40

45

De este modo, cuando los compuestos bifuncionales de la presente invención se acoplan al vehículo de suministro y se quela un radionúclido mediante el grupo  $R^1$  quelante, el paso de un fármaco (portado por el vehículo de

suministro) a través de un sujeto, puede monitorizarse mediante la obtención de imágenes por radionúclidos.

5 El grupo reactivo puede estar presente para acoplarse (además de a un resto biológico, un grupo de direccionamiento, una proteína, un polipéptido o un vehículo de suministro) a una marca de obtención de imágenes secundaria. Preferentemente, la marca de obtención de imágenes secundaria es una marca óptica, una marca paramagnética, tal como un SPIO, o un punto cuántico. Más preferentemente, la marca de obtención de etiquetas es un marca paramagnética que es un agente de contraste de IRM con una sonda paramagnética. Como alternativa, la marca de obtención de imágenes es una marca óptica que es una molécula orgánica o complejo metálico con propiedades fluorescentes o luminiscentes. La marca puede, por ejemplo, en el caso de una marca óptica o marca paramagnética, permitir que se use el compuesto bifuncional en la obtención de imágenes multimodales.

10 El grupo A reactivo puede acoplarse a otros restos biológicos, grupos de direccionamiento, proteínas, polipéptidos o vehículos de suministro. Por ejemplo, el compuesto bifuncional puede acoplar el radionúclido a un grupo de direccionamiento para dirigir células específicas en un sujeto y un liposoma que contiene una sustancia farmacéutica. De este modo, el suministro del fármaco dirigido puede monitorizarse durante su paso por el sistema biológico.

15 El método de la obtención de imágenes molecular puede incluir la introducción del compuesto bifuncional (o conjugado del mismo) en un sistema biológico (por ejemplo, un sujeto) ya sea antes de introducir el radionúclido en el sistema biológico (es decir, predireccionamiento) o después de que el radionúclido se haya quelado a la parte quelante del compuesto bifuncional (es decir, preensamblado).

20 Cuando el compuesto bifuncional (o conjugado) se introduce en el sistema biológico antes que el radionúclido, el compuesto bifuncional puede circular por el sistema biológico hasta una ubicación preferente o dirigida. Después, cuando se introduce el radionúclido, este puede pasar rápidamente por el sistema y quelarse a la molécula bifuncional (o conjugado). De este modo, el radionúclido puede unirse en una ubicación de interés al poco tiempo de haber sido introducido en el sistema biológico, de modo que se maximiza la eficacia del radionúclido.

25 Cuando el radionúclido se quela al compuesto bifuncional (o conjugado) antes de introducirlo en el sistema biológico, el compuesto bifuncional puede usarse para monitorizar el paso del compuesto bifuncional o del conjugado que tiene un resto biológico, un grupo de direccionamiento, una proteína, un polipéptido, un vehículo transportador o una marca de obtención de imágenes secundaria adherido al compuesto a través del sistema biológico.

30 Preferentemente, el resto biológico, el grupo de direccionamiento, la proteína, el polipéptido o vehículo de suministro están unidos al compuesto bifuncional para formar un conjugado de compuesto bifuncional antes de la introducción de la composición del compuesto bifuncional al sistema biológico o sujeto.

35 Preferentemente, el sistema biológico es un sujeto que se somete al diagnóstico o terapia de una enfermedad o afección. La terapia puede ser terapia por radionúclidos. En particular, la terapia puede ser un tratamiento contra el cáncer que usa el radionúclido o un agente quimioterapéutico asociado a la molécula bifuncional, por ejemplo, a través del vehículo de suministro al que está adherido. Preferentemente, la molécula bifuncional está asociada a o unida a un agente terapéutico. Como alternativa, el sujeto puede ser un sujeto en el que se está evaluando la biodistribución de la molécula de direccionamiento o del vehículo de suministro.

40 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un kit para su uso en un método de diagnóstico *in vivo* por obtención de imágenes moleculares o para su uso en un método de terapia por radionúclidos, comprendiendo el kit: una composición de compuesto bifuncional que tiene un compuesto bifuncional; y una composición que comprende un radionúclido tal y como se ha descrito en el presente documento.

45 Tal y como se describe en términos generales en el presente documento, existe un kit para su uso en un método de obtención de imágenes molecular o terapia que comprende: una composición de molécula bifuncional que tiene un compuesto bifuncional como se describe en el presente documento; y un resto biológico, un grupo de direccionamiento, una proteína, un polipéptido o un vehículo de suministro que se acopla a la molécula bifuncional. El kit también puede incluir una composición de obtención de imágenes que comprende un radionúclido como se describe en el presente documento.

50 Tal y como se describe en términos generales en el presente documento, existe un método de obtención de imágenes moleculares de una diana de interés en un sistema biológico, comprendiendo el método:

- 60 a) administrar a un sujeto una composición que comprende un compuesto bifuncional tal como se describe en el presente documento, en el que el compuesto está ligado a un resto biológico, un grupo de direccionamiento, una proteína, un polipéptido o un vehículo de suministro a través del grupo A reactivo;
- 65 b) administrar al sujeto un compuesto de obtención de imágenes que comprende un radionúclido, en el que el grupo R<sup>1</sup> quelante del compuesto bifuncional es capaz de quelar el radionúclido; y
- c) detectar el radionúclido para obtener una imagen de la diana de interés en el sistema biológico.



Tal y como se describe en términos generales en el presente documento, existe un método de obtención de imágenes moleculares de una diana de interés o paso de interés en un sistema biológico, comprendiendo el método:

- a) quelar un radionúclido a la molécula bifuncional a través del grupo quelante como se describe en el presente documento, en el que el compuesto está ligado a un resto biológico, un grupo de direccionamiento, una proteína, un polipéptido o un vehículo de suministro a través del grupo A reactivo, para formar un compuesto de molécula bifuncional marcada;
- b) administrar a un sujeto un compuesto que comprende el compuesto bifuncional marcado; y
- c) detectar el radionúclido para obtener una imagen de la diana o paso de interés en el sistema biológico.

Preferentemente, el radionúclido es un radionúclido capaz de suministrar radioterapia a la diana de interés. Preferentemente, el radionúclido es Cu-67, Re-186, Re-188, Y-90, Lu-177, Sc-47 o Bi-213.

Las características preferentes y opcionales de un cualquier aspecto pueden aplicarse a cualquier otro aspecto. En particular, las características preferentes de los compuestos bifuncionales se aplican al método de obtención de imágenes moleculares y viceversa.

A continuación, se describirán las realizaciones de la presente invención a modo de ejemplo y en relación con las figuras que acompañan.

#### Breve descripción de las figuras

**Figura 1** - Muestra el rendimiento del radiomarcaje de la parte quelante CP256 con  $^{67}\text{Ga}$  tras 5 minutos a temperatura ambiente en comparación con el rendimiento del radiomarcaje de DOTA con  $^{67}\text{Ga}$  tras 40 minutos a 80 °C.

**Figura 2** - Muestra los perfiles de elución de  $^{67}\text{Ga}$ -CP256 a partir de una columna de PD10 para soluciones radiomarcadas a 2,27  $\mu\text{M}$  (A) y 0,227  $\mu\text{M}$  (B) de CP256 tras la incubación con apotransferrina, en comparación con  $^{67}\text{Ga}$ -citrato (C).

**Figura 3** - Muestra la retención del  $^{67}\text{Ga}$ -cittrato,  $^{67}\text{Ga}$ -CP256,  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA y  $^{67}\text{Ga}$ -DTPA a 30 kDa con filtros MWCO, tras la incubación con apotransferrina.

**Figura 4** - Muestra el perfil de elución radioactivo, usando un cartucho de exclusión por tamaño PD10, del C2Ac y C2Ac-(7) tras 15 minutos de incubación con galio-68 en una solución tamponada de acetato; y

**Figura 5** - El conjugado marcado con  $^{68}\text{Ga}$  mostró una unión específica dependiente del calcio a la fosfatidilserina (PS) en un ensayo de unión de eritrocitos.

**Figura 6** - Muestra un escáner TEP de un ratón 90 minutos después de la administración de a) C2Ac-(7)- $^{68}\text{Ga}$  y b)  $^{68}\text{Ga}$  no quelado "libre".

**Figura 7** - La radiocromatografía de exclusión por tamaño (columna PD10) que muestra la quelación del  $^{68}\text{Ga}$  en CP256 en suero: a) control, cloruro de  $^{68}\text{Ga}$  en suero; b) control, realizado con el complejo  $^{68}\text{Ga}$ -CP256 incubado con suero; c) control,  $^{68}\text{Ga}$  incubado en solución tamponada; y d) muestra experimental, cloruro de  $^{68}\text{Ga}$  añadido a suero al que se había añadido CP256 (23  $\mu\text{M}$  o más).

**Figura 8** - El perfil de cromatografía de exclusión por tamaño PD10 de  $^{111}\text{In}$  tras la incubación de  $^{111}\text{In}$ -acetato y  $^{111}\text{In}$ -CP256 en suero, en comparación con  $^{111}\text{In}$ -CP256 en solución tamponada.

**Figura 9** - La biodistribución de  $^{67}\text{Ga}$ -CP256-SER4 (grupo 1),  $^{67}\text{Ga}$ -cittrato 5 minutos después de la inyección de SER4 (grupo 2), y  $^{67}\text{Ga}$ -cittrato 5 minutos después de la inyección de CP256-SER4 (grupo 3), en ratones de tipo silvestre (parte superior) o en ratones nuligénicos a la sialoadhesina (parte inferior).

**Figura 10** - La biodistribución de  $^{68}\text{Ga}$ -CP256-SER4 (grupo 1),  $^{68}\text{Ga}$ -acetato inyectado 1 hora después de la inyección de SER4 (grupo 2), y acetato de  $^{68}\text{Ga}$  inyectado 1 hora después de la inyección de CP256-SER4 (grupo 3), en ratones de tipo silvestre.

**Figura 11** - Figura 11A (izquierda): escáner TEP/TC (proyección de intensidad máxima) de un ratón del grupo 3 que muestra el direccionamiento previo usando CP256-SER4: ratones de 8 semanas de vida C57B1/6 inyectados con CP256-SER4 seguido de acetato de Ga-68, que muestran la absorción del hígado/bazo. Imagen tomada 1,5 horas después de la inyección. Figura 11B (derecha): para la comparación, a los ratones se les inyectó solamente Ga-68-acetato, mostrando la retención en la sangre y la acumulación en las articulaciones.

## Descripción detallada

### A: Direccionamiento hacia el sitio de interés

- 5 Cuando el compuesto bifuncional se acopla a una molécula de direccionamiento, un amplio abanico de grupos de direccionamiento principales puede ligarse a los compuestos bifuncionales para dirigir los compuestos bifuncionales con el grupo quelante hacia diferentes dianas de interés en el sistema biológico en cuestión.
- 10 En un aspecto, la diana de interés comprenderá un elemento de un par de unión específico que es capaz de unirse específicamente al grupo de direccionamiento principal en el sistema, de modo que serán elementos de un par de moléculas que tienen una especificidad particular para cada uno y que, en condiciones normales, se unen entre sí antes que unirse a otras moléculas. Entre los ejemplos de pares de unión específicos que se conocen bien en la materia se incluyen, por ejemplo, receptores y ligandos, enzimas y sustratos, anticuerpos y antígenos. De este modo, los grupos de direccionamiento principales pueden ser péptidos, proteínas u otras moléculas biológicas, tales como aptámeros, o ligandos de molécula pequeña, que se unen a dianas moleculares *in vivo* específicas. Entre las clases de dianas de interés se incluyen ligandos o receptores o transportadores expresados en células o tejido enfermo, en un antígeno de superficie celular asociado a estados patológicos, o marcadores tumorales, por ejemplo, marcadores específicos del cáncer o marcadores específicos de tejido.
- 15
- 20 Un grupo de grupos de direccionamiento principales es un grupo de polipéptidos capaces de unirse a la fosfatidilserina (PS), de modo que los conjugados moleculares bifuncionales de la presente invención pueden emplearse en los estudios de obtención de imágenes de la apoptosis o muerte celular. Entre los ejemplos de tales polipéptidos se incluyen la anexina V y el dominio C2 de una sinaptotagmina. Los polipéptidos que comprenden uno o más dominios C2 se conocen bien en la materia. Aunque algunos polipéptidos solo tienen un dominio C2, otros
- 25 tienen dos o más dominios C2, y los dominios se describen por lo general adhiriendo una letra (en orden alfabético) al extremo del nombre (por ejemplo, C2A, C2B, y así sucesivamente). Para una proteína que solo contiene un dominio C2, el dominio se denomina simplemente dominio C2. Aunque los ejemplos de a continuación usan el dominio C2A de la sinaptotagmina I de rata, podrían emplearse otros dominios C2 que sean capaces de unirse al PS, por ejemplo, un dominio C2A de una sinaptotagmina de otra especie. Entre otros ejemplos de proteínas que
- 30 contienen un dominio C2 se incluyen, pero no están limitados a la sinaptotagmina 1-13, los miembros de la familia de la proteína quinasa C de las quinasas serina/treonina, la fosfolipasa A2, la fosfolipasa  $\delta$ 1, los cofactores en la cascada de coagulación que incluyen los factores V y VIII, y los miembros de la familia Copine. Las sinaptotagminas humanas incluyen la sinaptotagmina 1-7, 12 y 13.
- 35 Otras proteínas que pueden emplearse en la presente invención incluyen los polipéptidos capaces de unirse específicamente a marcadores que se expresan mediante células cancerosas, posibilitando de este modo que puedan obtenerse imágenes de las células cancerosas usando los bioconjugados. A modo de ejemplo, la presente invención puede emplear un anticuerpo anti-CD33, o un fragmento del mismo, para obtener imágenes de las células cancerosas que expresan el CD33, tales como las células del linaje mielomonocítico y las células de la leucemia, véase Emberson *et al.*, J. Immunol. Methods. 305(2):135-51, 2005. Otro ejemplo es el uso de un inhibidor de tejido
- 40 de las metaloproteinasas (TIMP), tales como TIMP-2, para la obtención de imágenes de la expresión de la metaloproteinasas de matriz, puesto que la expresión de las metaloproteinasas está implicada en los procesos metastásicos, véase Emberson *et al.*, Bioconj. Chem. 12(6): 964-71, 2001. Otro ejemplo de un polipéptido que puede usarse para hacer conjugados según la presente invención es el receptor de complemento de tipo 2 (CR2).
- 45 Los anticuerpos capaces de unirse a la glucoproteína del antígeno carcinoembrionario (CEA) pueden usarse también como grupos de direccionamiento principales, ya que los miembros de esta familia de glucoproteínas se expresan en células de cáncer colorrectal, células de cáncer gástrico, células de cáncer pancreático, células de cáncer de pulmón, células de cáncer medular tiroideo y células de cáncer de mama.
- 50 Otro ejemplo puede aprovechar la afinidad o la secuencia peptídica arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) para la integrina  $\alpha_v\beta_3$  expresada de manera elevada en el endotelio de los tejidos que se someten a la angiogénesis, como puede observarse normalmente en los tumores, la placa aterosclerótica y en la reparación de tejido enfermo, tal como el miocardio infartado, ligando un derivado del péptido RGD al compuesto bifuncional mediante un grupo A reactivo adecuado.
- 55 Otro ejemplo puede aprovechar la afinidad del péptido Octeotride u otro análogo relacionado de la somatostatina, que puede unirse al receptor de la somatostatina expresado de manera elevada en la superficie de las células cancerígenas, por ejemplo, en los tumores carcinoides, en el carcinoma medular tiroideo y en otros tumores neuroendocrinos, ligando un péptido análogo de la somatostatina al compuesto bifuncional mediante un grupo A reactivo adecuado.
- 60 Otro ejemplo puede aprovechar la afinidad de los anticuerpos a las células de adhesión celular. Un ejemplo es la afinidad del anticuerpo monoclonal, SER 4, a la molécula de adhesión a los macrófagos, la sialoadhesina. La sialoadhesina se halla sobre la superficie de los macrófagos, y por ejemplo, en grandes cantidades sobre los
- 65 macrófagos del bazo, hígado, ganglios linfáticos, médula ósea, colon y pulmones.

El experto en la materia será capaz de usar otros grupos de direccionamiento, tales como la bombesina, gastrina o el péptido de direccionamiento a VCAM.

Preferentemente, el grupo de direccionamiento principal puede ligarse al compuesto bifuncional como conjugado que tiene un grupo funcional para unirse al compuesto bifuncional y el grupo reactivo para ligarse al grupo de direccionamiento principal. Para los expertos en la materia, será evidente que existen varias posibilidades de conseguir esto mismo. A modo de ejemplo, en una realización, puede emplearse un grupo reactivo para el ligamiento específico del sitio al grupo de direccionamiento principal, por ejemplo, un grupo maleimido para el ligamiento específico del sitio a los grupos tiol en una biomolécula tal como un péptido, polipéptido o anticuerpo. El grupo maleimido puede entonces ligarse específicamente al sitio en un grupo tiol, por ejemplo, de un residuo de cisteína incorporado específicamente al sitio en el péptido o proteína para tal fin. En otro ejemplo, el grupo reactivo en el quelante bifuncional sería un grupo aldehído o cetona capaz de reaccionar específicamente en el sitio con una proteína o péptido al que se ha incorporado específicamente en el sitio una hidracina o grupo similarmente reactivo (por ejemplo, usando un derivado del ácido hidracinonico) para formar una hidrazona o ligamiento similar.

En algunos casos, el grupo de direccionamiento principal puede comprender un polipéptido o proteína adecuados, o un fragmento o dominio de los mismos. En consecuencia, aunque que por comodidad los métodos del presente documento se describen por lo general con referencia a los "polipéptidos", también deberían incluirse secuencias más cortas de aminoácidos (por ejemplo, de 3 a 10 aminoácidos de longitud a 30, 40 o 50 aminoácidos de longitud), en ocasiones denominadas en la materia como péptidos. El término también debería incluir polipéptidos que tienen una estructura secundaria, terciaria o cuaternaria, generalmente denominada como proteínas, así como proteínas multidominio. En algunas realizaciones, y en los ejemplos proporcionados más adelante, los polipéptidos usados como grupos de direccionamiento principales son dominios proteicos. Los "dominios proteicos" son fragmentos de una proteína de longitud completa que tiene la habilidad de conservar la estructura independientemente de la proteína de longitud completa, formando normalmente una estructura tridimensional estable y plegada. Muchas proteínas consisten en varios dominios proteicos estructurales y es común hallar un dominio particular en un abanico de proteínas relacionadas. Los dominios proteicos varían en longitud desde entre aproximadamente 25 aminoácidos hasta 500 aminoácidos de longitud, o desde 50 aminoácidos hasta 250 aminoácidos, o desde 75 aminoácidos hasta 150 aminoácidos.

En la presente invención, donde el polipéptido es un anticuerpo, este término describe una inmunoglobulina tanto natural o producida parcial o totalmente de manera sintética. El término también engloba cualquier polipéptido o proteína que comprende el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo; fragmentos de anticuerpo que comprenden un dominio de unión al antígeno, tales como Fab, scFv, Fv, dAb, Fd; y diacuerpos. Es posible tomar los anticuerpos monoclonales y otros y usar técnicas de la tecnología del ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que conserven la especificidad del anticuerpo original. Tales técnicas pueden implicar la introducción de ADN que codifique la región variable de la inmunoglobulina, o las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), de un anticuerpo a las regiones constantes, o a las regiones constantes más las regiones marco conservadas, de una inmunoglobulina diferente. Véase, por ejemplo, los documentos EP 0 184 187 A, GB 2,188,638 A o EP 0 239 400 A.

Los anticuerpos pueden modificarse de varias formas, y el término "molécula de anticuerpo" debería interpretarse como que engloba cualquier elemento o sustancia de unión específica que tiene un dominio de unión al antígeno de anticuerpo con la especificidad requerida. De este modo, el presente término engloba los fragmentos y derivados de anticuerpo, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión a la inmunoglobulina, ya sea natural o total o parcialmente sintética. Por lo tanto, se incluyen las moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a la inmunoglobulina, o equivalente, fusionadas a otro polipéptido. La clonación y expresión de los anticuerpos quiméricos se describe en los documentos EP 0 120 694 A y EP 0 125 023 A. Se ha mostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de antígenos de unión. Entre los ejemplos de fragmentos de unión están: i) el fragmento Fab que consiste en dominios VL, VH, CL y CH1; ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo; iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. *et al.*, Nature 341, 544-546 (1989)) que consiste en un dominio VH; v) regiones CDR aisladas; vi) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados; vii) moléculas Fv monocatenarias (scFv), en las que se ligan un dominio VH y un dominio VL mediante un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión de antígeno (Bird *et al.*, Science, 242, 423-426, 1988; Huston *et al.*, PNAS USA, 85: 5879-5883, 1988); viii) dímeros de Fv monocatenario biespecíficos (PCT/US92/09965) y ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multispecíficos creados mediante fusión génica (WO 94/13804; Holliger *et al.*, P.N.A.S. EE.UU., 90: 6444-6448, 1993). Las moléculas de Fv, scFv o de diacuerpos pueden estabilizarse mediante la incorporación de puentes de disulfuro que ligan los dominios VH y VL (Reiter *et al.*, Nature Biotech, 14: 1239-1245, 1996). También pueden crearse minicuerpos que comprenden un scFv unido al dominio CH3 (Hu *et al.*, Cancer Res., 56: 3055-3061, 1996).

Los anticuerpos también pueden usarse como el grupo de direccionamiento principal. Los anticuerpos son pequeñas proteínas de afinidad elevada que pueden unirse específicamente a un gran número de proteínas o péptidos de direccionamiento. Los anticuerpos imitan a los anticuerpos monoclonales en muchos aspectos y se clasifican como miméticos de anticuerpos. La selección de anticuerpos no debería limitarse ya que en la materia se conocen muchos

aficuerpos, tales como el aficuerpo anti-TNF- $\alpha$  no conjugado. El aficuerpo anti-TNF- $\alpha$  no conjugado puede producirse en la *E. coli* y se dirige al factor de necrosis tumoral  $\alpha$  de la citocina humana, TNF- $\alpha$ . El TNF- $\alpha$  es una citocina inflamatoria pleiotrópica. La citocina se produce mediante varios tipos de células, pero especialmente mediante macrófagos. Actúa como mediador clave en la respuesta inmunitaria inflamatoria local y tiene otras funciones reguladoras inmunitarias. El TNF- $\alpha$  es una proteína de fase aguda que inicia una cascada de citocinas y aumenta la permeabilidad vascular, atrayendo de este modo macrófagos y neutrófilos hacia un sitio de infección. Por lo tanto, el TNF- $\alpha$  es una diana importante para la inflamación en las lesiones ateroscleróticas y las inflamaciones.

Cada compuesto bifuncional puede ligarse a una pluralidad de grupos de direccionamiento principales, aumentando de este modo: a) la afinidad de los grupos de direccionamiento principales para la diana de interés conforme la afinidad total aumenta como el producto de afinidad de cada grupo de direccionamiento para la diana y/o b) la velocidad de unión a la diana, es decir, la probabilidad de unión consecuyente de cada encuentro *in vivo* entre la diana y el grupo de direccionamiento principal.

*B: Sondas de obtención de imágenes* - Las sondas de obtención de imágenes que son capaces de unirse a los compuestos bifuncionales comprenden un radionúclido (unido mediante el grupo quelante).

Las sondas de obtención de imágenes (radioisótopos metálicos) empleadas de conformidad con la presente invención tienen la propiedad de unirse a la parte quelante de los compuestos bifuncionales ya sea *in vitro* o *in vivo*, ya sea en los enfoques predirigidos o preensamblados. Una posibilidad para conseguir esto es usar radionúclidos que tengan una afinidad de unión intrínseca de la parte quelante de los compuestos bifuncionales. A modo de ejemplo, el  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  es capaz de unirse a los grupos de hidroxipiridinona de la parte quelante y pueden usarse en las técnicas de obtención de imágenes TEP.

Las sondas de radionúclidos usadas de conformidad con la presente invención pueden emplear un abanico de diferentes radionúclidos dependiendo de la aplicación para la que están destinadas las sondas. Entre los ejemplos de radionúclidos que pueden formar parte de las sondas de la presente invención se incluyen los radionúclidos de tecnecio, renio, cobre, cobalto, galio, itrio, lutecio, indio, circonio, escandio, concretamente Tc-99m, Ga-67, In-111 (TEFU), Cu-64, Cu-60, Cu-61, Cu-62, Tc-94m, Ga-68, Co-55, Zr-89, Sc-44 (TEP), Cu-67, Re-186, Re-188, Y-90, Lu-177, Sc-47 o Bi-213 (terapia por radionúclidos). La presente invención puede emplear radionúclidos individuales o en combinación.

El radionúclido puede tener cualquier forma, tal como un solvato, hidrato, sal o quelato débil. Los solvatos, hidratos, sales y quelatos débiles de radionúclidos se conocen en la materia. Cuando el radionúclido ha de administrarse a un sujeto en una composición de radionúclido (por ejemplo, cuando el compuesto bifuncional se quela al radionúclido en el sujeto tras la administración), el radionúclido debería estar en una forma farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, el radionúclido puede ser una sal de citrato o acetato del ion metálico.

La presente invención puede también implicar el uso de marcas de obtención de imágenes secundarias, tales como una marca óptica o una marca paramagnética (a través del grupo A reactivo) que puede ligarse a o asociarse a los compuestos bifuncionales, por ejemplo, para posibilitar llevar a cabo la obtención de imágenes multimodal. Entre los ejemplos de sondas ópticas se incluyen fluoróforos tales como la fluoresceína y moléculas y complejos luminiscentes tales como los complejos de lantánido y los conjugados de tricarbonilrenio-quinolinato. La posibilidad de incorporar sondas ópticas, así como radionúclidos y agentes de contraste RM proporciona la oportunidad de combinar modalidades para mejorar el diagnóstico y la detección, por ejemplo, la ubicación de la enfermedad a nivel corporal total puede identificarse mediante el escaneo de todo el cuerpo con TEP o TEFU mientras puede detectarse visualmente el mismo marcador durante la cirugía para ayudar en la identificación del tejido enfermo. De manera similar, la obtención de imágenes combinada de TEP y RM puede proporcionar la ventaja de una alta sensibilidad (TEP, TEFU), cuantificación de la señal (TEP) y resolución anatómica (RM) y la medición del microentorno (RM con mejora de contraste).

#### *C: Química de la conjugación*

Los compuestos bifuncionales de la presente invención pueden usar un abanico de diferentes químicas y técnicas para ligar el resto biológico, el grupo de direccionamiento, la marca, la proteína o el polipéptido a los compuestos bifuncionales y/o para la introducción de otros grupos y propiedades en los compuestos bifuncionales de la presente invención.

De este modo, en la presente invención, el grupo reactivo proporciona una forma para acoplar el grupo dirigido al compuesto bifuncional, por ejemplo, cuando el grupo reactivo es un grupo maleimido (para unirse a la cadena lateral de tiol de la cisteína en la secuencia proteica/peptídica).

#### *Usos de la presente invención*

Los compuestos bifuncionales de la presente invención pueden usarse para la obtención de imágenes moleculares de enfermedades, tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades inmunitarias y condiciones

asociadas, tales como un trasplante, inflamación, seguimiento de leucocitos, seguimiento de células madre, alergia e infección. Los compuestos bifuncionales también pueden emplearse en la terapia por radionúclidos para tratar el cáncer y la artritis.

- 5 Las aplicaciones de los compuestos bifuncionales y los radionúclidos de la presente invención incluyen un amplio abanico de aplicaciones de obtención de imágenes y espectroscópicas que pueden emplear el radionúclido y/u otra marca, por ejemplo, en estudios de obtención de imágenes multimodales. Tal como se describe en el presente documento, los compuestos bifuncionales son particularmente útiles para las aplicaciones de obtención de imágenes *in vivo*, tales como la obtención de imágenes de muerte celular, por ejemplo, usando compuestos bifuncionales para
- 10 la detección de la apoptosis. Esto podría ser útil en un número de diferentes aplicaciones médicas o de investigación, por ejemplo, en los campos de la oncología (por ejemplo, para monitorizar la respuesta a la quimioterapia), la medicina cardiovascular (por ejemplo, para obtener imágenes del miocardio dañado tras un infarto de miocardio) o de rechazo de injertos (por ejemplo, para obtener imágenes del rechazo del aloinjerto cardíaco).
- 15 La presente invención es particularmente relevante para las técnicas de obtención de imágenes de la medicina nuclear, tales como la tomografía por emisión de fotón único (TEFU), una técnica de obtención de imágenes que detecta los rayos gamma emitidos por parte de un radionúclido para producir una imagen tridimensional de la distribución del radionúclido en una muestra o sujeto, y la tomografía por emisión de positrones (TEP), una técnica de obtención de imágenes que proporciona imágenes tridimensionales detectando pares de rayos gamma emitidos
- 20 indirectamente por parte de un radionúclido emisor de positrones introducido en una muestra o sujeto. A modo de ejemplo, los estudios TEFU pueden llevarse a cabo usando In-111 y los estudios TEP usando Ga-68. El experto en la materia, sin embargo, será consciente de que pueden emplearse otros radionúclidos para TEFU y TEP en la presente invención. En general, la presente invención puede emplearse para la tomografía por emisión de positrones (TEP), la tomografía por emisión de fotón único (TEFU), la obtención de imágenes ópticas (IO) y/o la obtención de
- 25 imágenes por resonancia magnética (IRM) mediante la selección apropiada de una sonda de obtención de imágenes, o para la terapia por radionúclidos mediante la selección del radionúclido apropiado (por ejemplo, Y-90, Lu-177).

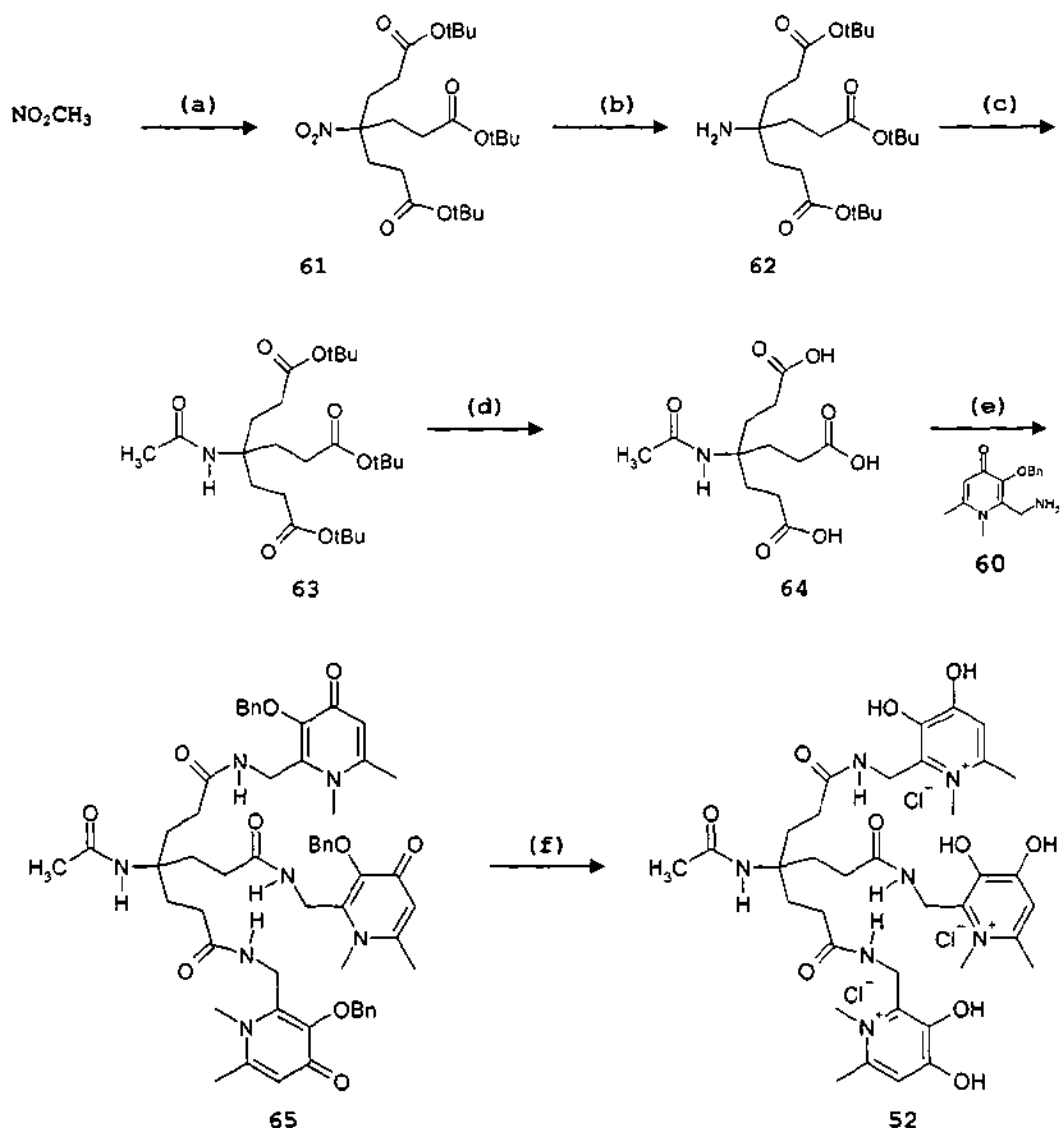
30 Los compuestos bifuncionales de la presente invención pueden usarse en métodos de obtención de imágenes bifuncionales, en los que la información o las imágenes proceden de dos técnicas diferentes, ya sea mediante la detección de la sonda de obtención de imágenes posible de detectar usando dos técnicas diferentes, o mediante la provisión de una segunda marca en el sitio del sistema biológico donde se localizan los compuestos bifuncionales, más convenientemente, mediante el ligamiento o la asociación de la segunda marca con los compuestos bifuncionales, tal y como se ha explicado con detalle anteriormente. Los estudios multimodales se registrarán

35 conjuntamente, y pueden suponer la obtención simultánea de imágenes con dos modalidades o puede ser necesario llevarlos a cabo en dos etapas, pero generalmente emplearán la misma muestra, de modo que puede compararse la información espacial obtenida usando las dos técnicas. Entre los ejemplos de obtención de imágenes multimodal se incluyen TEP/TC, TEFU/TC, TEP/RM y TEFU/RM.

#### 40 Ejemplos

##### Ejemplo 1 - Síntesis del quelante CP256 (Compuesto 52)

45 Los ésteres de tris *terc*-butilo **61** y **62** se sintetizaron mediante los siguientes métodos bibliográficos establecidos (G. R. Newkome, R. K. Behera, C. N. Moorefield and G. R. Baker, J Org Chem, 1991,56, 7162-7167).



Síntesis de **52**. Materiales y métodos: (a) Tritos B, Acrilato de *tert*-nutilo, DME, 70 °C; (b) T-1 Ni Raney, H<sub>2</sub>, 25 °C, EtOH; (c) CH<sub>3</sub>COCl, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0-25 °C, (d) HCOOH; (e) **60**, DCCI, HoBt, DMF 25 °C; (f) Pd/C, H<sub>2</sub>, HCl, CH<sub>3</sub>OH, 25 °C.

5

Se produjo nitro tripod **61** por la reacción de nitrometano y acrilato de *tert*-butilo en presencia de hidróxido de benciltrimetilamonio y la recristalización a partir de etanol con un rendimiento del 57 %. Después, el grupo nitro de **61** se redujo a una amina para formar **62** mediante la hidrogenación con un catalizador T-1 de níquel Raney,<sup>5</sup> que se preparó especialmente a partir de una aleación de níquel/aluminio. La acetilación de **62** con cloruro de acetilo y purificación por cromatografía en columna dio **63** con un rendimiento del 72 %. Después, los grupos *tert*-butilo se retiraron con ácido fórmico y el producto, el compuesto **64** se recristalizó en etanol/éter de petróleo con un rendimiento del 93 %.

10

La conjugación de los restos bidentados con la estructura tridimensional y posterior desprotección para crear **52** se muestra de manera esquemática anteriormente. Se hizo reaccionar 1 equivalente de tri-ácido **64** con 3,6 equivalentes del compuesto bidentado **60** en una reacción de acoplamiento con DCCI and HOBT en DMF. Después de la retirada del disolvente, el ligando hexadentado protegido **65** se purificó por cromatografía en columna con un rendimiento del 50 %. Los grupos protectores bencilo se retiraron por hidrogenación catalítica (Pd/C) en una solución ácida (HCl) de metanol. Después de la retirada del catalizador, la sal tris HCl de **52** se precipitó en metanol/dietiléter y se secó al vacío, dando como resultado 0,4 g (74 %) de **52** en forma de un sólido de color blanco.

15

20

#### Detalles experimentales

Todos los productos químicos se adquirieron de Sigma Aldrich y Acros Organics y eran de grado reactivo o mejor.

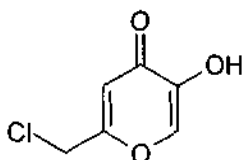
25

Los disolventes se adquirieron de Fisher Scientific, Sigma Aldrich y VWR. Los disolventes de RMN se adquirieron de GOSS Scientific y los tubos de RMN se fabricaron por Wilmad. Las placas de TLC (gel de sílice 60 UV<sub>254</sub> sobre soporte de alúmina) y gel de sílice para cromatografía en columna se adquirieron de Merck.

- 5 Las muestras se secaron en un horno de vacío (Gallenkamp, evaluadas a  $\leq 250$  °C) conectado a una bomba de vacío (BOC- Edwards.) Las muestras se hidrogenaron en un hidrogenador Parr (temperatura ambiente) a 275,79 KPa (40 psi) con agitación automática. Los espectros de infrarrojos se adquirieron en un espectro Perkin Elmer un FTIR usando discos KBr. El programa informático usado se llamaba "Spectrum."
- 10 Los espectros de RMN <sup>1</sup>H se adquirieron en un imán Ultra-shield de 400 MHz (Bruker) y con el programa informático XWin-NMR. Los espectros se analizaron en un programa informático MestReNova versión 5.3 (Mestrelab Research). Las muestras de espectrometría de masas se sometieron al Centro de Espectrometría de Masas EPSRC, Swansea o la instalación de la Espectrometría de Masas, King's College, Londres. Las muestras en EPSRC se realizaron en un espectrómetro de masas cuadrupolar Waters ZQ4000 (IEN), un espectrómetro de masas de doble focalización Finnigan MAT 95 XP de alta resolución (EI, CI) o un espectrómetro de masas de cuadrupolos Quattro II de Micromass (EI). Las muestras en el King's College se realizaron en un espectrómetro de masas de trampas térmicas Thermofisher LCQ DECA XP.

20 Las distribuciones isotópicas se calcularon usando la Calculadora de Peso Molecular versión 6.46. Los datos del gráfico resultante se extrajeron y procesaron en Microsoft Excel 2003.

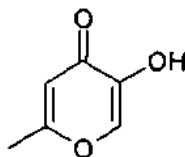
#### 2-Clorometil-5-hidroxi-4(1H)-ona (ácido clorokójico) (54)



- 25 Se añadieron 50 g de ácido kójico (350 mmol, 1 equiv.) a 220 ml de cloruro de tionilo con agitación. El recipiente de reacción se enfrió con hielo y la mezcla se agitó durante 1 hora hasta que se hubo formado una suspensión de color amarillo brillante. La mezcla se filtró al vacío para dar un sólido en bruto de color blanco después de lavarse con éter de petróleo. Este sólido se recrystalizó en agua caliente para dar 40 g de cristales de color blanquecino con un rendimiento del 71 %.

30 **RMN <sup>1</sup>H** (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\sigma$  9,2 (s, 1H 3-OH) 8,1 (s, 1H 2-H) 6,5 (s, 1H 5-H) 4,6 (s, 2H 6-CH<sub>2</sub>-Cl)

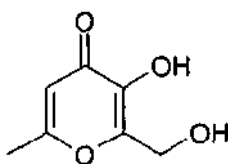
#### 2-Metil-5-hidroxi-4(1H)-ona (Allomaltol) (55)



- 35 Se añadieron 20 g de ácido clorokójico (54) (125 mmol, 1 equiv.) a 100 ml de agua destilada y se agitó a 50 °C. Se añadió lentamente polvo de cinc (17 g) a la solución y la temperatura se incrementó a 70 °C. Se añadieron gota a gota 40 ml de HCl concentrado en la mezcla en agitación lentamente durante un periodo de 90 minutos. Durante este tiempo, el ácido clorokójico se disolvió. Después de agitar durante un adicional de 3 horas a 70-80 °C, la solución, ahora de color negro pardo se filtró en caliente para retirar cualquier sólido. Después de un periodo de refrigeración, el producto se extrajo con 5 porciones X 70 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La solución se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y el disolvente se retiró al vacío. EL sólido en bruto se recrystalizó en isopropanol caliente, dando como resultado 8,63 g de cristales de color beis con un rendimiento del 55 %.

45 **RMN <sup>1</sup>H** (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\sigma$  9,0 (s, 1H 2-H) 8,0 (s, 1H 3-OH) 6,2 (s, 1H 5-H) 2,2 (s, 3H 6-CH<sub>3</sub>)

#### 2-Hidroximetil-3-hidroxi-6-metil-piran-4(1 H)-ona (56)

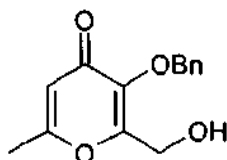


- 50 Se añadieron 3 g de allomaltol (55) (23,8 mmol, 1 equiv.) a una solución en agitación de 1,05 g de NaOH en 25 ml agua destilada. Se añadieron gota a gota 2,2 ml de una solución al 37 % de formaldehído durante 10 minutos. La

solución se agitó durante un adicional de 18 horas a temperatura ambiente. El pH se ajustó a 1 con HCl concentrado momento en el cual se formó un precipitado de color blanco. Para permitir la precipitación completa, la solución se enfrió a 4 °C durante 24 horas. El sólido se filtró y se lavó con éter dietílico frío y se secó al vacío dando como resultado 2,92 g de un sólido de color blanco con un rendimiento del 78 %.

5 **RMN <sup>1</sup>H** (DMSO-d<sub>6</sub>) σ 8,8 (s, 1H 3-OH) 6,2 (s, 1H 5-H) 4,3 (s, 2H 2-CH<sub>2</sub>-OH) 2,2 (s, 3H 6-CH<sub>3</sub>)

**2-Hidroximetil-3-benciloxi-6-metil-piran-4(1H)-ona (57)**



10

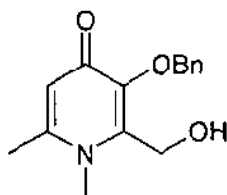
A 60 ml de CH<sub>3</sub>OH se le añadieron 10 g de 56 (64 mmol, 1 equiv.) y la solución se calentó a reflujo. Una solución de 2,82 g de NaOH (70 mmol, 1,1 equiv.) en 6 ml H<sub>2</sub>O se añadió lentamente a la solución de reflujo. Se gotearon lentamente 12,05 g de bromuro de bencilo (70 mmol, 1,1 equiv.) en la solución de reflujo durante 30 minutos. La solución se calentó a reflujo durante un adicional de 16 horas. El disolvente se retiró al vacío y el residuo se recogió en 180 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El NaBr insoluble se retiró por filtración. La capa orgánica se lavó con dos porciones de 100 ml de NaOH acuoso al 5 % y después con 2 porciones X 100 ml de agua, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se evaporó para dejar un aceite de color claro. El aceite se recrystalizó en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y éter de petróleo para dar 9,8 g de un sólido de color blanco con un rendimiento del 62 %.

15

**m/z** 247 (M+H)<sup>+</sup> [ES<sup>+</sup>]

20 **RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) σ 7,25 (m, 5H 3-O-CH<sub>2</sub>-Bnz) 6,1 (s, 1H 5-H) 5,1 (s, 2H 3-O-CH<sub>2</sub>-Bnz) 4,2 (m, 2H 2-CH<sub>2</sub>-OH) 2,15 (s, 3H 6-CH<sub>3</sub>)

**1,6-Dimetil-2-hidroximetil-3-benciloxipiridin-4(1 H)-ona (58)**



25

Se añadieron 4,92 g de 57 (20 mmol, 1 equiv.) a 60 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> con agitación. Se añadieron 3,4 g de 3,4-dihidro-2-H-pirano (42,5 mmol, 2,2 equiv.) seguido de 60 mg de ácido p-toluenosulfónico como un catalizador. Después de agitar durante 3 horas la mezcla se añadió a un embudo de separación y se lavó con 2 X 40 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5 %) seguido de 2 X 40 ml de agua destilada. La capa orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se evaporó para dar un aceite de color amarillo, que se disolvió de nuevo en 20 ml de EtOH. Se añadieron 200 ml de NH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (40 %, acuoso) y la mezcla se agitó a 70 °C durante 18 horas. El disolvente se retiró al vacío y el aceite resultante se disolvió de nuevo en 40 ml de EtOH. Se añadieron 2 ml de HCl concentrado (37 %) y la solución se calentó a reflujo durante 4 horas. El disolvente se retiró al vacío y se añadieron 100 ml de agua destilada al residuo. La solución se lavó con 2 X 50 ml de éter dietílico. Después, el pH de la fase acuosa se ajustó a 9 con NaOH acuoso 10 N. La solución se añadió a un embudo de separación y se extrajo con 4 X 100 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La capa orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se retiró para dar un sólido en bruto de color pardo, que se recrystalizó en CH<sub>3</sub>OH y éter dietílico para dar 2,8 g de cristales de color blanco con un rendimiento del 54 %.

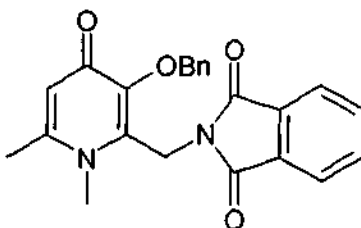
30

35

**m/z** 260 (M+H)<sup>+</sup> [ES<sup>+</sup>]

40 **RMN <sup>1</sup>H** (DMSO) σ 7,3-7,5 (m, 5H 3-O-CH<sub>2</sub>-Bnz) 6,15 (s, 1H 5-H) 5,4 (m, 1H 2-CH<sub>2</sub>-OH) 5,0 (s, 2H 3-O-CH<sub>2</sub>-Bnz) 4,5 (m, 2H 2-CH<sub>2</sub>-OH) 3,58 (s, 3H 6-CH<sub>3</sub>) 2,28 (s, 3H 1-N-CH<sub>3</sub>)

**1,6-Dimetil-2-ftalimidometil-3-benciloxipiridin-4(1H)-ona (59)**



45

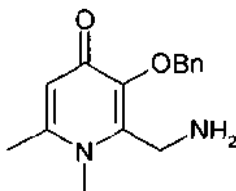
Se añadieron 8,6 g de trifetilfosfina (32 mmol, 1,2 equiv.) y 4,8 g de ftalimida (32 mmol, 1,2 equiv.) a una suspensión agitada de 58 (7 g, 27 mmol, 1 equiv.) en 150 ml de THF a 0 °C. Se añadieron gota a gota 6,47 g de azodicarboxilato



de diisopropilo [DIAD] (32 mmol, 1,2 equiv.) durante 30 minutos. La solución se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante un adicional de 17 horas, tiempo después del cual la solución se filtró. El sólido se lavó con THF frío para dar 9,92 g de un sólido amorfo de color blanco con un rendimiento del 95 %.

5 **RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>)  $\sigma$  7,65 (m, 4H 2-CH<sub>2</sub>-Ftalimida) 7,15 (m, 5H 3-O-CH<sub>2</sub>-Bnz) 6,25 (s, 1H 5-H) 5,35 (s, 2H 3-O-CH<sub>2</sub>-Bnz) 4,75 (s, 2H 2-CH<sub>2</sub>-Ftalimida) 3,5 (s, 3H 1-N-CH<sub>3</sub>) 2,1 (s, 3H 6-CH<sub>3</sub>)

#### 1,6-Dimetil-2-aminometil-3-benciloxipiridin-4(1H)-ona (60)

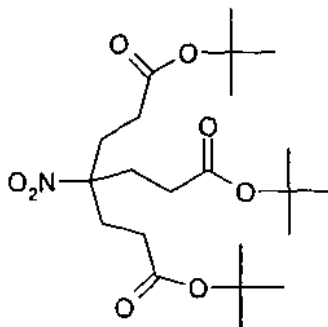


10 Se disolvieron 10 g de **59** (26 mmol, 1 equiv.) en 100 ml de EtOH. Se añadieron 17 ml de N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (acuoso al 5,5 %) y la solución se calentó a reflujo durante 3 horas. El **59** no se disolvió completamente hasta que el reflujo había comenzado. La solución se dejó enfriar, momento en el cual se solidificó. Se añadió agua y el pH se ajustó a 1 con HCl conc. Después de enfriarse durante una noche a 4 °C, la solución se filtró. El pH del filtrado se ajustó a 14 con NaOH 10 N y se extrajo con 5 X 100 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Los extractos se combinaron y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El disolvente se retiró al vacío para dar 6,2 g de un sólido de color blanco con un rendimiento del 92 %.

**m/z** 259 (M+H)<sup>+</sup> [ES<sup>+</sup>]

15 **RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>)  $\sigma$  7,25 (m, 5H 3-O-CH<sub>2</sub>-Bnz) 6,35 (s, 1H 5-H) 5,25 (s, 2H 3-O-CH<sub>2</sub>-Bnz) 3,7 (s, 2H 2-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) 3,6 (s, 3H 1-N-CH<sub>3</sub>) 2,3 (s, 3H 6-CH<sub>3</sub>)

#### 20 4-Nitro-4-[2-(*terc*-butoxicarbonil)etil]-heptanodioato de di-*terc*-butilo (61)



25 Se añadieron 1,53 g de nitrometano (25 mmol, 1 equiv.) a 10 ml 1,2-dimetoxietano (DME). Se añadieron 0,25 ml de hidróxido de benciltrimetilamonio (Triton B) y la solución se calentó a 70 °C. Se añadieron 9,93 g de acrilato de *terc*-butilo (77,5 mmol, 3,1 equiv.) en porciones de 1 ml junto con otras 2 porciones X 0,25 ml de Triton B para mantener la temperatura 70-80 °C. Después de la adición completa de los reactivos, la solución se calentó a 70 °C durante una hora adicional. El disolvente se retiró al vacío y el residuo se volvió a disolver en 60 ml de CHCl<sub>3</sub> y se colocó en un embudo de separación. La capa orgánica se lavó con 20 ml de HCl (acuoso al 10 %) seguido de 3 X 20 ml de una solución de NaCl conc. La capa orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el disolvente se retiró al vacío. El producto en bruto se recrystalizó en EtOH caliente, se filtró y se lavó con EtOH enfriado con hielo para dar 6,4 g de cristales de color blanco con un rendimiento del 57 %.

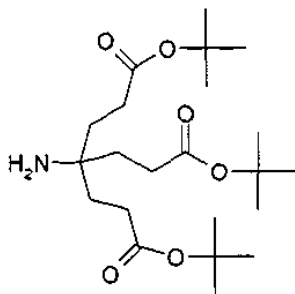
**m/z** 463 (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup> [CI]

35 **RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>)  $\sigma$  2,2 (s, 12H [CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO-tbu]<sub>3</sub>) 1,45 (s, 27H [CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO-tbu]<sub>3</sub>)

**IR** (KBr) 2975s (CH<sub>2</sub>), 1723s (C=O), 1536s (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>

#### Catalizador T-1 de níquel Raney

40 A un matraz de fondo redondo de tres bocas de 1 l se le añadieron 600 ml de una solución al 10 % de NaOH seguido de 40 g de aleación de Níquel-Aluminio. La solución se agitó con una barra de agitación magnética y se calentó a una temperatura de 90 - 95 °C. Después de 40 minutos de calentamiento, el níquel comenzó a adherirse al agitador magnético, impidiendo el proceso de agitación. En este punto, la agitación se continuó manualmente con una varilla de vidrio. El calentamiento se interrumpió después de una hora y el níquel se dejó sedimentar. Una vez que el catalizador de níquel se había sedimentado y la solución se había enfriado, el sobrenadante se decantó y se descargó. El catalizador se lavó con 3 X 200 ml de agua destilada y 5 X 50 ml de etanol. Se tomó precaución para asegurar que el catalizador se cubrió con líquido y no se expuso al aire durante las etapas de lavado. Después, el catalizador se almacenó en un refrigerador a 4 °C en 50 ml de etanol.

**4-Amino-4-[2-(*terc*-butoxicarbonil)etil]-heptanodioato de di-*terc*-butilo (62)**

5 Se disolvieron 5 g de **61** (11,24 mmol, 1 equiv.) en 100 ml de EtOH. Se añadieron 4 g de catalizador T-1 de níquel Raney.

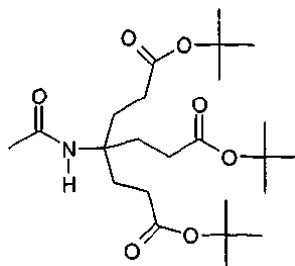
La solución se hidrogenó a 275,79 KPa (40 psi) (temperatura ambiente) durante 7 días. Durante este periodo, la presión de H<sub>2</sub> se mantuvo a 275,79 KPa (40 psi) y la reacción se detuvo una vez que la presión dejó de reducirse aún más. El **61** no se disolvió completamente al principio, sino que se hizo durante el periodo de hidrogenación.

10 La solución se filtró a través de celite y el disolvente se retiró al vacío para dar 4,5 g de un aceite con rendimiento cuantitativo, que se solidificó tras un periodo de reposo durante unos pocos días.

**m/z** 416  $\sigma$  (M+H)<sup>+</sup> [ES<sup>+</sup>]

**RMN** <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\sigma$  2,2 (m, 6H [CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO-tbu]<sub>3</sub>) 1,6  $\sigma$  (m, 6H [CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO-tbu]<sub>3</sub>) 1,45 (s, 27H (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO-tbu)<sub>3</sub>)

15 **IR** (KBr) 3376s (NH<sub>2</sub>) 2978s (CH<sub>2</sub>), 1730s (C=O) cm<sup>-1</sup>

**Éster di-*terc*-butílico del ácido 4-acetilamino-4-(2-*terc*-butoxicarbonil-etil)-heptanodioico (63)**

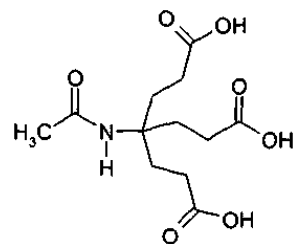
20 A 5 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se le añadieron 1 g de triéster **62** (2,4 mmol, 1 equiv.) y 0,3 g de trietilamina (2,9 mmol, 1,2 equiv.) La solución se enfrió a 0 °C con un baño de hielo y se añadieron gota a gota 0,23 g de cloruro de acetilo (2,9 mmol, 1,2 equiv.). La solución se agitó durante un adicional de 4 horas y se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente. La solución se vertió en un embudo de separación y se lavó con 2 X 15 ml HCl (acuoso al 5 %) y NaCl

25 concentrado 1 X 15 ml. La solución se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el disolvente se retiró al vacío. El residuo se disolvió en EtOAc mínimo y se cargó en una columna de sílice, en la que se purificó por cromatografía en columna con EtOAc y hexano (1: 1) para dar 0,79 g de un sólido de color blanco con un rendimiento del 72 %.

**m/z** 458 (M+H)<sup>+</sup> 475 (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup> [ES<sup>+</sup>]

**RMN** <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\sigma$  7,2 (s, 1H [CONH]) 2,0 (m, 6H [CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO-tbu]<sub>3</sub>) 1,8 (s, 3H [CH<sub>3</sub>-CO]) 1,7 (m, 6H [CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO-tbu]<sub>3</sub>) 1,35 (s, 27H [CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO-tbu]<sub>3</sub>)

30

**Ácido 4-acetilamino-4-(2-carboxi-etil)-heptanodioico (64)**

35 Se añadieron 1,5 g de triéster **63** (3,28 mmol) a 20 ml de ácido fórmico (96 %) y se agitó durante 4 horas. Después de este tiempo, el ácido fórmico se retiró mediante destilación azeotrópica con 5 porciones X 20 ml de tolueno. El residuo en bruto se recristalizó en EtOH y éter de petróleo para dar 0,9 g de cristales de color blanquecino con un rendimiento del 93 %.

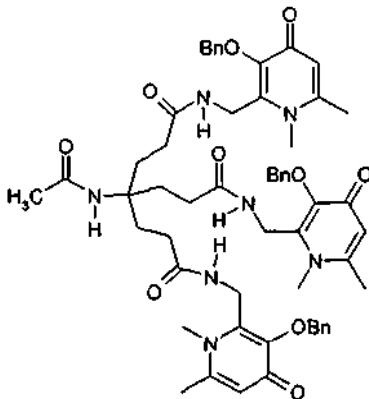
**m/z** 290 (M+H)<sup>+</sup> [ES<sup>+</sup>]

40 **RMN** <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\sigma$  12 (s, 3H [CH<sub>2</sub>-COOH]) 7,2 (s, 1H [N-H]) 2,1 (m, 6H [CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH]<sub>3</sub>) 1,8 (m, 6H [CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-

COO-*t*bu)<sub>3</sub>) 1,7 (s, 3H [CH<sub>3</sub>-CO])

bis-[(3-Benciloxi-1,6-dimetil-4-oxo-1,4-dihidro-piridin-2-ilmetil)-amida] del ácido 4-acetilamino-4-{2-[(3-benciloxi-1,6-dimetil-4-oxo-1,4-dihidro-piridin-2-ilmetil)-carbamoil]-etil}-heptanodioico (65)

5



A 10 ml de DMF anhidra en un matraz de fondo redondo de 100 ml se le añadieron 0,4 g de **64** (1,38 mmol, 1 equiv.) 1,29 g de **60** (4,98 mmol, 3,6 equiv.) 0,67 g de HOBt (4,98 mmol, 3,6 equiv.) y 1,03 g de DCCI (4,98 mmol, 3,6 equiv.) La mezcla se agitó durante 48 horas a temperatura ambiente en una atmósfera de N<sub>2</sub>. La solución se filtró para retirar el DCU precipitado. La DMF se retiró al vacío. El residuo se disolvió en metanol y se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice) con una fase móvil 4:1 de CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH. Las fracciones se combinaron, se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y el disolvente se retiró al vacío para dar 0,7 g de un sólido de color blanco con un rendimiento del 50 %.

10

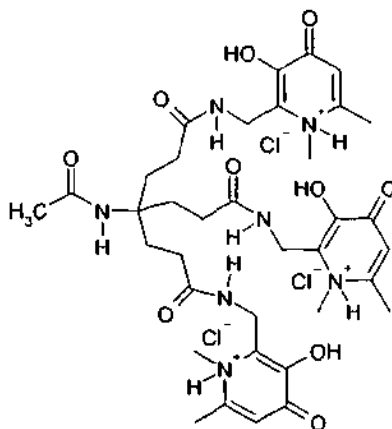
15

**m/z** 1010 (M+H)<sup>+</sup> 1032 (M+Na)<sup>+</sup> [ES<sup>+</sup>]

**RMN** <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\sigma$  8 (t, 3H [CONH]) 7,3 (m, 15H [CH<sub>2</sub>-Bnz]) 7,15 (s, 1H [CONH]) 6,2 (s, 3H [5-H piridinona]) 5,05 (s, 6H [CH<sub>2</sub>-Bnz]) 4,3 (d, 6H [CONH-CH<sub>2</sub>-piridinona]) 3,35 (s, 9H [6-CH<sub>3</sub> piridinona]) 2,2 (s, 9H [N-CH<sub>3</sub> piridinona]) 2,0 (m, 6H [CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH-piridinona]) 1,75 (m, 6H [CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH-piridinona]) 1,7 (s, 3H [CH<sub>3</sub>-CONH-tripod])

20

sal tris clorhidrato de bis-[(3-hidroxi-1,6-dimetil-4-oxo-1,4-dihidro-piridin-2-ilmetil)-amida] del ácido 4-acetilamino-4-{2-[(3-hidroxi-1,6-dimetil-4-oxo-1,4-dihidro-piridin-2-ilmetil)-carbamoil]-etil}-heptanodioico (**52**) (CP256)



25

Se disolvieron 0,64 g de **65** (0,63 mmol, 1 equiv.) en 40 ml de CH<sub>3</sub>OH en un matraz de hidrogenación de paredes gruesas. Se añadieron 2,3 ml de HCl (1,25 M en CH<sub>3</sub>OH) a la solución. Se añadieron 0,2 g de catalizador de Pd/C y la solución se hidrogenó durante 18 horas (temperatura ambiente, 275,79 KPa (40 psi)). El matraz se retiró con cuidado y la solución se filtró para retirar el Pd/C. El disolvente se retiró al vacío. El residuo se disolvió de nuevo en metanol mínimo. El producto (**52**) se precipitó con éter dietílico. Una vez que el precipitado se había sedimentado, el sobrenadante se retiró y el precipitado se lavó con éter dietílico frío. El proceso se repitió 3 veces y el disolvente se retiró al vacío para dar 0,4 g de la sal tris clorhidrato de **52** en forma de un sólido de color blanco con un rendimiento del 74 %. **m/z** 740,4 (M+H)<sup>+</sup> 370,7 (M+2H)<sup>2+</sup>

30

35

**RMN** <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\sigma$  8,8 (t, 3H [CONH]) 7,25 (s, 1H [CONH]) 7,1 (s, 3H [5-H piridinona]) 4,5 (d, 6H [CONH-CH<sub>2</sub>-piridinona]) 3,8 (s, 9H [6-CH<sub>3</sub> piridinona]) 2,55 (s, 9H [N-CH<sub>3</sub> piridinona]) 2,1 (m, 6H [CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH-piridinona]) 1,8 (m, 6H [CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH-piridinona]) 1,7 (s, 3H [CH<sub>3</sub>-CONH-tripod])

### **Ejemplo 2 - Caracterización de los complejos de galio y hierro del procedimiento de marcaje CP256 y Ga-67**

La formación de los complejos Ga-CP256 y Fe-CP256 es evidente a partir de los datos espectrales de masa mostrados en la Tabla 1 y la Tabla 2. Se detectó la forma protonada de cada complejo y la distribución isotópica del espectro de masas coincide con los valores calculados registrados en la tabla 1. El complejo Ga-CP256 tiene dos especies moleculares para  $(M + H)^+$ , a  $m/z$  806 y  $m/z$  808, debido a que el galio tiene dos isótopos estables con masas atómicas de 69 y 71. No se encontró evidencia de complejos Ga-CP256 con relaciones Ga:ligando distintas de 1:1.

Los datos del espectro de masas para el complejo Fe-CP256 coinciden con las distribuciones isotópicas predichas.

#### 10 Fórmulas moleculares y masas isotópicas

CP256:	$C_{36}H_{49}N_7O_{10}$	(M = 739,3541)
Ga-CP256:	$C_{36}H_{46}N_7O_{10}Ga$	(M = 805,2562)
Fe-CP256:	$C_{36}H_{46}N_7O_{10}[^{56}Fe]$	(M = 792,2656)

Tabla 1. Resumen de los resultados CL-EM

Muestra	Tiempo de retención de CL (min)	Especies	m/z (calculado)	m/z (encontrado)
CP256	5,1	$(M + H)^+$	740,3614	740,3631
		$(M + 2H)^{2+}$	370,6843	370,6865
Ga-CP256	5,3	$(M + H)^+$	806,2635	806,2636
		$(M + Na)^+$	828,2454	828,2448
		$(M + 2H)^{2+}$	403,6354	403,6367
		$(M + H + Na)^{2+}$	414,6263	414,6266
		$(M + 2Na)^{2+}$	425,6173	425,6180
Fe-CP256	5,4	$(M + H)^+$	793,2728	793,2733
		$(M + Na)^+$	815,2548	815,2545
		$(M + 2H)^{2+}$	397,1401	397,1401
		$(M + H + Na)^{2+}$	408,1310	408,1316
		$(M + 2Na)^{2+}$	419,1220	419,1230

15 El radiomarcaje CP256 con Ga-67 dio un producto cuya HPLC mostró un único pico radiactivo con un tiempo de elución idéntico al del complejo Ga-CP256 "frío".

Tabla 2. Distribuciones isotópicas calculadas y experimentales de Ga-CP256 y Fe-CP256 y el ligando CP256.

Distribución isotópica para $(C_{36}H_{46}N_7O_{10}Ga + H)^+$	
m/z: Calculada/(encontrada)	% de abundancia relativa: Calculada/(encontrada)
806,2635/ (806,2635)	100,00/(100,00)
807,2635/ (807,2655)	42,59/(41,73)
808,2635/ (808,2634)	77,28/(76,99)
809,2635/ (809,2653)	30,34/(29,20)
810,2635/ (810,2670)	7,56/(7,36)
Distribución isotópica para $(C_{36}H_{46}N_7O_{10}Fe + H)^+$	
m/z: Calculada/(encontrada)	% de abundancia relativa: Calculada/(encontrada)
791,2775/ (791,2779)	6,33/(5,47)
792,2775/ (792,2768)	2,69/(2,92)
793,2775/ (793,2741)	100,00/(100,00)
794,2775/ (794,2765)	49,72/(42,20)
795,2775/ (795,2782)	12,14/(10,88)
Distribución isotópica para $(C_{36}H_{49}N_7O_{10} + 2H)^{2+}$	
m/z: Calculada/(encontrada)	% de abundancia relativa: Calculada/(encontrada)
370,6843/(370,6858)	100,00/(100,00)
371,1843/(371,1869)	42,64/(51,38)
371,6843/(371,6887)	10,93/(14,26)

#### 20 Detalles experimentales Preparación de complejos

##### Ga-CP256

25 Se disolvió 1 mg de CP256 en 1 ml de metanol para dar una concentración de ligando de 1,18 mM (basado en el aducto de tris HCl de CP256 con RMM de 848). Esta solución se añadió a 0,3 mg de  $Ga(NO_3)_3$  anhidro (RMM 255) para dar una estequiometría metal a ligando de 1: 1 a una concentración de 1,18 mM.

**Fe-CP256**

El complejo Fe<sup>3+</sup> se produjo en un procedimiento análogo al complejo Ga<sup>3+</sup>, pero como Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O (RMM = 386) como la fuente de metal.

5

**Análisis de la muestra**

Las muestras se analizaron por CL-EM. El sistema HPLC fue un sistema Agilent 1200 con desgasificador, bomba cuaternaria, Detector de longitud de onda variable UV-visible y un autoamplificador. El espectrómetro de masas fue un Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF CL/EM. Las muestras se adquirieron usando el programa informático de adquisición de estación de trabajo Agilent Masshunter y los datos se analizaron usando el programa informático de análisis cualitativo Agilent Masshunter. La columna de HPLC usada fue una columna Agilent Zorbax SB cartucho C18 (2,1 mm X 30 mm, 3,5 µm.) El caudal del eluyente era de 0,5 ml/min y la fase móvil era un gradiente usando reactivos de grado de espectrometría de masas: A = H<sub>2</sub>O + ácido fórmico al 0,1 % (Fluka, 34673) y B = metanol + ácido fórmico al 0,1 % (Fluka, 34671). El gradiente se da en la Tabla 3. Los espectros se adquirieron usando ionización por electronebulización en modo positivo usando corrección de masa de referencia con hexakis(1H,1H,3H-etrafluoropropoxi)fosfazina (C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>SN<sub>3</sub>O<sub>6</sub>P<sub>3</sub>F<sub>24</sub>, m/z = 922,0098 [M + H]<sup>+</sup>). Las distribuciones isotópicas se calcularon usando la Calculadora de Peso Molecular versión 6.46.

20

**Tabla 3.** Gradiente para el análisis de CL-EM de CP256 y los complejos Fe<sup>3+</sup> y Ga<sup>3+</sup>.

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
1	95	5
10	5	95
20	5	95
23	95	5
30	95	5

HPLC de muestras radiomarcadas**Análisis de HPLC**

25

Los análisis de HPLC se realizaron con un detector FC3600 y una sonda detectora y conectada en serie. El sistema HPLC, fue un Agilent 1200 series con bomba cuadruple, desgasificador, detector de UV y un inyector de jeringa manual. La columna de HPLC usada para todos los análisis fue un Agilent Eclipse XDB-C18 (5 µm, 4,6 mm X 150 mm) con una columna de protección. El programa informático analítico usado para radio-TLC y radio-HPLC fue Laura (Lablogic). Todos los reactivos generales y consumibles se adquirieron de Sigma-Aldrich o de Fisher Scientific. La solución <sup>67</sup>Ga-citrato para inyección se obtuvo de Mallinkrodt Medical, 74 MBq/ml (fecha de ref.; contiene citrato sódico 6,5 mM, NaCl 135 mM, alcohol bencílico al 0,9 %).

30

**Procedimiento de radiomarcaje para análisis HPLC**

35

Se preparó una solución madre de 1 mg/ml de CP256 en tampón PBS en un tubo de microcentrifugado de plástico de 1 ml. Se prepararon soluciones de radiomarcaje añadiendo una alícuota de 10 µl de la solución madre a 90 µl de tampón de marcado en un tubo de microcentrifugado de plástico para dar una concentración de ligando total de 0,1 µl/ml en 100 µl. Esta solución se radiomarcó añadiendo 10 µl de <sup>67</sup>Ga-citrato. Las condiciones de radiomarcaje se muestran en la tabla 4.

40

**Tabla 4.** Condiciones de radiomarcaje para CP256 con <sup>67</sup>Ga

LIGANDO	TAMPÓN DE MARCAJE	TEMPERATURA DE MARCAJE	TIEMPO DE MARCAJE	CONC. DE LIGANDO (M)	pH MEDIDO
CP256	PBS	25 °C	1 min	1,18 X 10 <sup>-4</sup>	6,6

**fase móvil de HPLC**

45

Gradiente lineal de B al 10 % a 0 minutos hasta B al 90 % a 15 minutos. (A = TFA al 0,1 % en H<sub>2</sub>O, B = TFA al 0,1 % en Metanol). El caudal fue de 1 ml/min.

**Inyección de muestra de HPLC**

50

Se inyectaron manualmente 20 µl de la muestra en la HPLC usando una jeringuilla de HPLC de 25 µl.

**Ejemplo 3 - Eficacia de marcate CP256 con datos Ga-67**

55

Los resultados de radiomarcaje en la tabla 5, medidos por Cromatografía de Capa Delgada (TLC) muestran que los

radiomarcadores CP256 con  $^{67}\text{Ga}$  a temperatura ambiente a concentraciones menores que DOTA se hacen a temperatura elevada, con radiomarcaje al 100 % a una concentración tan baja como 10  $\mu\text{M}$  mientras que el rendimiento de radiomarcaje para DOTA a 10  $\mu\text{M}$  es solo el 35 %. Estos resultados se muestran gráficamente en la figura 1.

5

**Tabla 5.** Rendimientos de radiomarcaje de  $^{67}\text{Ga}$ -CP256 y  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA. Calculado para análisis TLC.

CONCENTRACIÓN DE LIGANDO	RADIOINDICADOR CP256	RENDIMIENTO DE MARCAJE DOTA
1 mM	100	100
100 $\mu\text{M}$	100	100
10 $\mu\text{M}$	100	35
1 $\mu\text{M}$	84	0
100 nM	0	0
10 nM	0	0

#### Detalles experimentales

10 Todos los reactivos generales y consumibles se adquirieron de Sigma-Aldrich o de Fisher Scientific. Los productos químicos y consumibles especializados se adquirieron como sigue a continuación: Solución tampón de acetato pH 4,6 (Sigma Aldrich 31048-1L); Solución  $^{67}\text{Ga}$ -citrato para inyección (Mallinkrodt Medical) 74 MBq/ml (fecha de ref.; contiene citrato sódico 6,5 mM, NaCl 135 mM, alcohol bencilico al 0,9 %); placas de vidrio de TLC (gel de sílice 60, F<sub>254</sub>, 2 50 mm X 750 mm) (Merck); tiras ITLC-SG (Pall Sciences).

15

#### Procedimiento para manchar y ejecutar placas de TLC

Las placas de TLC de sílice y las tiras de ITLC-SG se mancharon con 1  $\mu\text{l}$  de complejo radiomarcado en el origen, que se marcó a 5 mm a lápiz. Se dejaron secar las manchas sobre placas de TLC de gel de sílice, pero no para las tiras de ITLC-SG. Las placas se colocaron en una cámara de revelado (botella de muestra de 100 ml de cuello ancho) rellena con una profundidad de 3 mm de la fase móvil. Las fases estacionarias y las fases móviles se enumeran en la tabla 8. La placa de TLC se desarrolló hasta que el frente de disolvente había alcanzado una distancia de hasta 65 mm. Las placas se retiraron de la cámara de revelado y se secaron en un horno ajustado a 80 °C. Los rendimientos radioquímicos se determinaron usando el programa informático Laura o el programa informático de imágenes instantáneas.

25

Los análisis de TLC y ITLC se llevaron a cabo en un escáner de TLC Mini-Scan con detector FC3600 y una sonda detectora  $\gamma$ . El programa informático analítico usado fue Laura (Lablogic). Las muestras radiactivas se contaron durante 10 segundos (ventana 101-110) en un contador Gamma Compugamma 1282 (LKB Wallac) usando el programa informático Ultroterm. El calibrador de dosis utilizado para medir la radiactividad en las muestras fue un CRC-25R (Capintec). La autorradiografía electrónica se realizó en un programa informático de Imagen Instantánea Packard con Imagen versión 2.05. La mezcla gaseosa fue isobutano al 1 %, dióxido de carbono al 2,5 % y argón al 96,5 % (Air products).

30

#### Procedimiento de radiomarcaje para la determinación del rendimiento radioquímico por análisis TLC

Se prepararon soluciones madre de 1,25 mM de cada ligando en el tampón de marcaje apropiado, como se enumera en la tabla 6.

La solución madre se diluyó 10 veces mediante adición sucesiva del tampón de radiomarcaje para crear soluciones adicionales con concentraciones de ligando de 125  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 1,25  $\mu\text{M}$ , 125 nM y 12,5 nM. Se añadieron ochenta microlitros de cada solución a un tubo de microcentrifugado de plástico y se radiomarcó con 20  $\mu\text{l}$  de  $^{67}\text{Ga}$ -citrato (1,5 MBq) para producir soluciones radiomarcadas con concentraciones finales de ligando de 1 mM, 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  y 100 nM. Se usó un bloque de calentador metálico (que contenía aceite en los pocillos) para calentar la solución  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA. Las condiciones de radiomarcaje se muestran en la tabla 6.

45

**Tabla 6.** Condiciones de radiomarcaje para cada ligando. Las concentraciones finales de cada ligando en la mezcla de marcaje fueron de 1 mM, 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 100 nM y 10 nM.

LIGANDO	TAMPÓN DE MARCAJE	TEMPERATURA DE MARCAJE	TIEMPO DE MARCAJE	pH MEDIDO
DOTA	Acetato	80 °C	45 min	4,6
CP256	PBS	25 °C	1 min	6,6

#### Ejemplo 4 - CP256 marcado con Ga-67 - estabilidad cinética

50

##### Estabilidad de $^{67}\text{Ga}$ -CP256 en apo-transferina mediante exclusión por tamaño de PD10

La Figura 2 muestra los perfiles de elución de  $^{67}\text{Ga}$ -CP256 de una columna PD10 para soluciones radiomarcadas a

100 µM (A) y 10 µM (B) de CP256. después de la dilución e incubación en apo-transferrina, las concentraciones de CP256 en estas soluciones fueron 227 µM y 2,27 nM, respectivamente. Después de 4 horas de incubación en apo-transferrina, el perfil es el mismo que el de la incubación en el tampón de referencia, indicando que no hay unión de <sup>67</sup>Ga a transferrina o pérdida de <sup>67</sup>Ga del ligando, para cualquiera de las soluciones de 2,27 µM o 227 nM.

5 Estabilidad radiofarmacéutica usando filtros de MWCO de 30 kDa

10 Como se muestra en la tabla 7 y en la figura 3, la unión residual de todos los indicadores radiomarcados a la membrana filtrante fue baja (≤ 5%). El setenta y tres por ciento de la radiactividad de la incubación de <sup>67</sup>Ga-citrato en apo-transferrina se asoció con el filtro MWCO después de 4 horas. El método MWCO también mostró una transquelación despreciable de <sup>67</sup>Ga a apo-transferrina (≤ 1 %) en las soluciones <sup>67</sup>Ga-CP256 y <sup>67</sup>Ga-DOTA durante el período de incubación de 4 horas. En el caso de la solución CP256 100 µM (2,27 µM en apo-transferrina) la unión de fondo de la incubación en el tampón de referencia fue mayor en 1 %. <sup>67</sup>Ga-DTPA mostró cierta disociación durante el período de incubación de 4 horas, con un 10 % de unión extra de la radiactividad en esta solución al filtro cuando se compara con la solución en el tampón de referencia.

**Tabla 7.** Unión de <sup>67</sup>Ga-citrato, <sup>67</sup>Ga-CP2 56, <sup>67</sup>Ga-DOTA y <sup>67</sup>Ga-DTPA a filtros de MWCO de 30 kDa.

INDICADOR	% DE RADIOACTIVIDAD UNIDA AL FILTRO DE MWCO EN LA INCUBACIÓN DE APO-TRANSFERRINA DE TAMPÓN DE REFERENCIA, DESPUÉS DE 4 HORAS	
<sup>67</sup> Ga-CITRATO	1,7 ± 0,5	73,0 ± 4,1
<sup>67</sup> Ga-CP256 (10 µM)	3,5 ± 1,3	3,9 ± 0,8
<sup>67</sup> Ga-CP256 (100 µM)	9,9 ± 0,5	3,8 ± 0,5
<sup>67</sup> Ga-DOTA	1,5 ± 1,7	2,6 ± 0,8
<sup>67</sup> Ga-DTPA	1,5 ± 0,6	11,4 ± 1,4

20 Detalles experimentales

25 Los productos químicos y consumibles especializados se adquirieron como sigue a continuación: apo-transferrina humana (Sigma Aldrich T5391-10MG); filtros de MWCO 30 kDa Sartorius Vivaspin 500 (Fisher Scientific FDP-875-025B); columnas PD10 (GE Healthcare 17-0851-01); espectrofotometría UV de apo-transferrina se realizó en un espectrofotómetro Cary UV con el programa informático Cary WinUV. La longitud de onda se ajustó a 280 nm.

**Tabla 8.** Detalles de fases móviles y fases estacionarias usadas para el control de calidad TLC e ITLC de <sup>67</sup>Ga-CP2 56, <sup>67</sup>Ga-DOTA y <sup>67</sup>Ga-DTPA.

RADIOINDICADOR	FASE MÓVIL	FASE ESTACIONARIA
<sup>67</sup> Ga-CP256	Metanol/ácido cítrico (0,5 M)/formiato amónico (10 % en peso, v) [40/20/40]	Gel de Sílice
<sup>67</sup> Ga-DOTA	Citrato sódico (ac.) [0,3 M]	Gel de Sílice
<sup>67</sup> Ga-DTPA	Metanol/ácido cítrico (0,5 M)/formiato amónico (10 % en peso, v) [40/20/40]	Gel de Sílice
	Metanol/ácido acético (0,5 M) formiato amónico (10 % en peso, v) [40/20/40]	Gel de Sílice
	Ácido acético [0,5 M]	Gel de Sílice
	9/1/0,1 metanol/ácido acético glacial/citrato sódico [0,3 M]	ITLC-SG
	Citrato sódico [0,1 M]	ITLC-SG

30 Preparación de la solución de referencia <sup>67</sup>Ga-citrato

Una solución de referencia de <sup>67</sup>Ga-citrato se produjo mediante la incubación de 20 µl <sup>67</sup>Ga-citrato en 200 µl PBS. Esta solución se incubó a 37 °C en un bloque de calentamiento metálico y se retiraron las muestras para su análisis de la misma manera que para la incubación en suero.

35 Preparación de la solución de apo-transferrina

Se preparó tampón TRIS-HCl 50 mM (pH 7,5) por dilución de una solución madre 1 M. Se añadió bicarbonato sódico a una concentración de 25 mM. Se preparó una solución de apo-transferrina de 2,5 mg/ml (32 µM) en este tampón.

40 Preparación de <sup>67</sup>Ga-indicadores

Las soluciones de todos los indicadores se radiomarcaban a una concentración de 100 µM. También se preparó una solución CP256 10 µM. Véase la tabla 9 para las condiciones de radiomarcaje.

45 Se añadió una alícuota de 10 µl de cada indicador radiomarcado a 30 µl de un tampón apropiado para neutralizar el pH entre 7 y 7,5. Este tampón fue TRIS-HCl 2 M (pH 7,5) en el caso de aquellos indicadores marcados en el tampón

de acetato. Para las preparaciones de  $^{67}\text{Ga}$ -CP256 y  $^{67}\text{Ga}$ -citrato el tampón fue PBS. Los detalles pueden verse en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Condiciones de radiomarcaje del indicador.

LIGANDO	CONC. DE LIGANDO DESPUÉS DEL RADIOMARCAJE	TAMPÓN DE RADIOMARCAJE	TAMPÓN DE DILUCIÓN	CONC. DE LIGANDO FINAL
DOTA	100 $\mu\text{M}$	Acetato	TRIS	25 $\mu\text{M}$
DTPA	100 $\mu\text{M}$	Acetato	TRIS	25 $\mu\text{M}$
CP256	100 $\mu\text{M}$	PBS	PBS	25 $\mu\text{M}$
	10 $\mu\text{M}$	PBS	PBS	2,5 $\mu\text{M}$

5

#### Incubación de indicador en Apo-Transferrina

La solución de Apo-transferrina (200  $\mu\text{l}$ ) en un tubo de microcentrifugada de plástico se incubó a 37 °C en un bloque de calentamiento metálico. A esta se le añadieron 20  $\mu\text{l}$  de cada indicador neutralizado por pH. También se incubaron 20  $\mu\text{l}$  de cada indicador en un tampón de referencia (que no contenía apo-transferrina) de TRIS-HCl 50 mM que contenía bicarbonato sódico 25 mM.

10

#### Incubación del Indicador en el Tampón de Referencia

La solución TRIS-HCl 50 mM (200  $\mu\text{l}$ , que no contenía apo-transferrina) se incubó en un bloque de calentamiento a 37 °C. Se añadió el indicador ajustado al pH apropiado (20  $\mu\text{l}$ ) a la incubación. Se tomaron alícuotas a intervalos apropiados para el análisis.

15

#### Filtración en gel usando una columna PD10.

20

#### **Incubaciones de Apo-transferrina**

El equilibrado y la elución de las columnas PD10 se realizó con bicarbonato sódico 25 mM añadido al tampón de elución de PBS. Los perfiles de elución estándar de  $^{67}\text{Ga}$ -citrato,  $^{67}\text{Ga}$ -CP2 56,  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA y  $^{67}\text{Ga}$ -DTPA se determinaron añadiendo 20  $\mu\text{l}$  de cada indicador que se había incubado en el tampón de referencia (TRIS-HCl 50 mM que contenía bicarbonato sódico 25 mM) y eluyendo las columnas como se ha descrito anteriormente.

25

#### **Para calcular el porcentaje de actividad eluida total por cada fracción de 0,5 ml**

La radiactividad total eluida para cada columna se calculó sumando los recuentos para cada una de las 30 fracciones. La actividad eluida para cada fracción se calculó entonces mediante la siguiente ecuación:

30

$$\frac{\text{Recuento por fracción}}{\text{Total recuentos (para un total de 30 fracciones)}} \times 100$$

35

#### **Perfil de elución UV de Apo-transferrina de una columna de filtración en gel PD10**

El perfil de elución de Transferrina desde una columna PD10 se determinó por espectrofotometría UV. Se cargó apo-transferrina (no radioactiva, 500  $\mu\text{l}$  de la solución de 2,5 mg/ml) sobre una columna PD10, eluyendo con tampón PBS y se recogieron fracciones de 0,5 ml. Las muestras se cargaron en una cubeta de cuarzo de 1 ml y se diluyeron hasta 0,9 ml con un extra de 0,4 ml de PBS. La absorbancia se determinó a 280 nm con PBS como una referencia convencional.

40

#### **Determinación de la estabilidad del indicador usando filtros de microcentrifugado MWCO de 30 kDa**

45

Se aplicó PBS (100  $\mu\text{l}$ , que contenía bicarbonato 25 mM) a la sección superior (sección del filtro) del tubo. Se añadió la solución de incubación (5  $\mu\text{l}$ ) para cada indicador (después de 4 horas) y se centrifugó el tubo en una microcentrifugadora a 10000 g durante 8 minutos. Se aplicaron otros 100  $\mu\text{l}$  de PBS para lavar y se centrifugó de nuevo el tubo a 10000 g durante otros 8 minutos. La sección de filtro del tubo se retiró y se contó separadamente del tubo en un contador gamma. El porcentaje de unión de la radiactividad al filtro MWCO se calculó usando la siguiente ecuación:

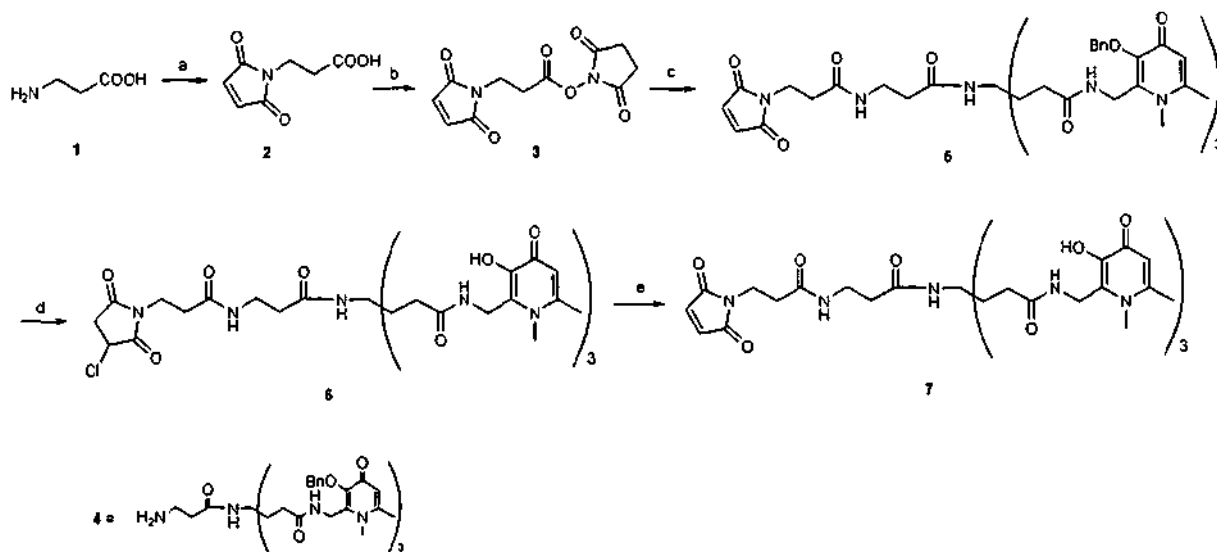
50

$$\frac{\text{Recuentos de la sección del filtro}}{\text{Recuentos de la sección del filtro+ recuentos de la sección del tubo}} \times 100$$

55

El análisis se realizó por triplicado después de 4 horas para las incubaciones de apo-transferrina. El análisis se realizó 6 veces (6 tubos) para las incubaciones en el tampón de referencia TRIS-HCl 50 mM. Los valores medios se tomaron como se ha descrito anteriormente.



**Ejemplo 5 - Síntesis de conjugados de CP256-maleimida**

- 5 Síntesis de quelante hexadentado unido a maleimida 7. a) anhídrido maleico/DMF; b) DCC/NHS/DMF; c) 4/DMF; d) BCl<sub>3</sub>/DCM; e) Et<sub>3</sub>N/DCM.

**Detalles experimentales**

- 10 La síntesis del compuesto 4 se ha indicado previamente (Zhou T. et al., J Med Chem. 2006, 49, 4171-4182).

**Síntesis de 3-maleimidopropanoato de succinimido 3**

- 15 Una solución de β-alanina (1,8 g, 20 mmol) y anhídrido maleico (2 g, 20 mmol) en DMF (30 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Después de que el sólido se disolviese completamente, se añadieron N-hidroxisuccinimida (NHS; 2,3 g, 20 mmol) y diciclohexilcarbodiimida (DCC; 4,6 g, 24 mmol) en la solución y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La solución se filtró y el precipitado se lavó con agua (100 ml) y diclorometano (100 ml). El filtrado se recogió y la capa orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> al 5 % 3x50 ml y una vez con salmuera. La capa orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el diclorometano se retiró a presión reducida para obtener un sólido de color blanco (55 %). Este sólido no necesita purificación adicional y puede usarse directamente para la siguiente etapa de acoplamiento. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2,82 (s, 4H, dos succinimido-CH<sub>2</sub>), 3,02 (t, J=7,0 Hz, 2H, COCH<sub>2</sub>), 3,94 (t, J=7,0 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 6,74 (s, 2H, dos CH).

**25 Síntesis del compuesto 5**

- El ácido activado 3 (6 mmol) y la amina 4 (5 mmol) en DMF anhidra (50 ml) se agitó a temperatura ambiente durante un día. El disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se purificó sobre una columna de gel de sílice usando cloroformo:metanol (8:2) como eluyente para proporcionar una espuma de color blanco (81 %). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2,05 (s a, 6H, CH<sub>2</sub>), 2,15 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 2,23 (s a, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,29 (s a, 6H, CH<sub>2</sub>), 2,41 (t, J=6,6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,32 (s a, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,36 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 3,73 (t, J=6, Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,35 (s, 6H, CH<sub>2</sub>), 4,87 (s, 6H, CH<sub>2</sub>), 6,10 (s, 3H, CH), 6,65 (s, 2H, CH), 6,76 (s a, 1H, NH), 7,23-7,30 (m, 15H, ArH), 7,72 (s a, 3H, NH). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): 20,81 (CH<sub>3</sub>), 30,70 (CH<sub>2</sub>), 31,71 (CH<sub>2</sub>), 34,43 (CH<sub>2</sub>), 34,62 (CH<sub>2</sub>), 34,82 (CH<sub>2</sub>), 36,31 (CH<sub>3</sub>), 36,68 (CH<sub>2</sub>), 57,99, 73,42 (CH<sub>2</sub>), 118,25 (CH), 128,30 (CH), 128,52 (CH), 128,58 (CH), 134,23 (CH), 136,97, 141,05, 146,35, 148,04, 170,43, 170,66, 171,70, 173,10, 173,23. IEN-EM: 1190,40 (M+1)<sup>+</sup>

**Síntesis del compuesto 6**

- Al compuesto de protección de bencilo 5 en DCM anhidro en N<sub>2</sub> se le añadió tricloruro de boro (12 equiv.) en un baño de hielo y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. El exceso de BCl<sub>3</sub> se inactivó añadiendo MeOH seguido de 1 ml de ácido clorhídrico concentrado. La mezcla se evaporó para obtener un sólido de color pardo, que se disolvió en metanol y se precipitó con la adición de acetona. Este procedimiento se repitió tres veces para proporcionar un sólido de color blanco (72 %). RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 1,75-1,84 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 2,08-2,13 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 2,21 (t, J=7,1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,32 (t, J=7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,57 (s, 9H, CH<sub>2</sub>), 2,85 (dd, J=4,1, 8,3 Hz, 1H, un H de CH<sub>2</sub> maleico), 3,16 (c, J=6,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,34 (dd, J=8,5, 18,3Hz, 1H, un H de CH<sub>2</sub> maleico), 3,58 (t, J=7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,89 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 4,57 (d, J=5,0 Hz, 6H, CH<sub>2</sub>), 4,99 (dd, J = 4,1/8,5 Hz, 1H de CH maleico), 7,28 (s, 3H, CH), 7,30 (s a, 1H, NH), 8,09 (t, J=5,6 Hz, 1H, NH), 8,92 (t, J=5,1 Hz, 3H, NH). RMN <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>, 100

MHz):  $\delta$  20,56 (CH<sub>3</sub>), 29,26, (CH<sub>2</sub>), 29,98 (CH<sub>2</sub>), 32,67 (CH<sub>2</sub>), 34,71 (CH<sub>2</sub>), 35,27 (CH<sub>2</sub>), 35,58 (CH<sub>2</sub>), 35,83 (CH<sub>2</sub>), 39,00 (CH<sub>2</sub>), 39,05 (CH<sub>3</sub>), 49,82 (CH), 56,79, 112,73 (CH), 139,90, 142,69, 148,55, 159,59, 169,12, 170,08, 173,18, 173,36, 173,44. IEN-EM: 956,27 (M+1)<sup>+</sup>. HRMS: Calc. para C<sub>44</sub>H<sub>59</sub>ClN<sub>9</sub>O<sub>13</sub> (M+1)<sup>+</sup>, 956,3921; Encontrado, 956,3953.

## 5 Síntesis del compuesto 7

Al compuesto 6 (20 mg) en DCM (20 ml) se le añadió Et<sub>3</sub>N en exceso y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después de la evaporación para retirar el disolvente, el residuo se cargó en una columna de extracción en fase sólida disolviendo en 1 ml de solución de ácido fórmico al 0,1 %. La columna se lavó en primer lugar con ácido fórmico al 0,1 % (10 ml) para retirar la sal de clorhidrato de trietilamina, seguido de elución de metanol (10 ml). La fracción de la solución de metanol se concentró y se secó mediante horno de vacío para dar un polvo blanco (80 %). RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz):  $\delta$  1,94-2,03 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 2,20-2,29 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 2,32 (t, J=6,3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,38 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 2,42 (t, J=7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,31 (c, J=6,7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,66 (s, 9H, CH<sub>2</sub>), 3,69 (t, J=7,1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,58 (s, 6H, CH<sub>2</sub>), 5,25 (s, 3H, NH), 6,29 (s, 3H, CH), 6,81 (s, 2H, CH). RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz):  $\delta$  21,03 (CH<sub>3</sub>), 30,11, (CH<sub>2</sub>), 31,48 (CH<sub>2</sub>), 35,43 (CH<sub>2</sub>), 35,69 (CH<sub>2</sub>), 36,02 (CH<sub>2</sub>), 37,21 (CH<sub>3</sub>), 37,49 (CH<sub>2</sub>), 59,17, 63,70 (CH<sub>2</sub>), 114,58 (CH), 129,59, 132,25, 135,57 (CH), 147,38, 148,87, 171,12, 172,26, 172,98, 173,33, 175,89. IEN-EM: 920,33 (M+1)<sup>+</sup>. HRMS: Calc. para C<sub>44</sub>H<sub>58</sub>N<sub>9</sub>O<sub>13</sub> (M+1)<sup>+</sup>, 920,4154; Encontrado, 920,4146.

### Ejemplo 6 - Conjugación de CP256-clorosuccinimida (6) o CP256-maleimida (7) con proteína C2Ac

C2A es una pequeña proteína que reconoce la fosfatidilserina mostrada en las células sometidas a apoptosis. Se ha diseñado con un residuo de cisteína para facilitar el marcaje específico del sitio con agentes reactivos con tiol (véase Tavare R, Torres Martin de Rosales R, Blower PJ, Mullen GED. Efficient site-specific radiolabeling of a modified C2A domain of synaptotagmin I with [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>. a new radiopharmaceutical for imaging cell death. Bioconjugate Chem 2009; 20:2071-2081). La proteína manipulada resultante (C2Ac) se conjugó con CP256 usando 6 o 7. El mismo producto se obtuvo para ambas reacciones de conjugación.

El peso molecular medio de C2Ac es 14997 y por lo tanto se esperaba que el conjugado C2Ac- (7) tuviera un peso molecular medio de 15918,44. El peso molecular medio encontrado fue 15970,85, que corresponde al conjugado C2Ac-(7) con un átomo de hierro adicional y sin 3 átomos de hidrógeno.

#### Detalles experimentales

Se trató C2Ac (2 mg en una solución de 2 mg/ml) con un exceso molar de 3:1 de quelante hexadentato de clorosuccinimida (6) o quelante de maleimida-hexadentato (7) durante 4 horas a temperatura ambiente. La mezcla se purificó usando una columna PD-10 previamente equilibrada con PBS que se había almacenado sobre Chelex y se analizó mediante CL-EM.

### Ejemplo 7 - Marcaje de conjugado de proteína C2Ac con <sup>68</sup>Ga y datos funcionales sobre proteína marcada

El conjugado C2Ac- (7) se marcó radiactivamente con <sup>68</sup>Ga de acuerdo con el método descrito en el presente documento. La Figura 4 muestra un alto grado de quelación después de solo 15 minutos de incubación con <sup>68</sup>Ga en tampón acetato. El conjugado marcado con <sup>68</sup>Ga mostró una unión dependiente del calcio específica a la fosfatidilserina (PS) en un ensayo de unión a glóbulos rojos (véase la Fig. 5).

#### Detalles experimentales

Se preparó <sup>68</sup>Ga sin quelar en tampón, como sigue a continuación. El generador se eluyó con 2 ml de HCl 0,1 M para dar el eluato de <sup>68</sup>Ga 25 MBq. Se añadieron 1,5 ml de ácido clorhídrico conc. (36 %) a la elución para dar una concentración final de HCl 4 M para formar anión de tetracloruro de galio y la solución pasó a través de una columna de intercambio aniónico (SAX SPEC, Chromafix 30-PS- HCO<sub>3</sub>, 45 mg, Macherey-Nagel, Alemania), atrapando toda la actividad. La columna se lavó después con 250  $\mu$ l de NaCl 5 M y la actividad se eluyó con 300  $\mu$ l de agua destilada y el eluato (pH <1, ~70 MBq) se tamponó añadiendo 5  $\mu$ l de NaOH 1 M y 30  $\mu$ l de tampón de acetato amónico 1 M, pH 6, elevando el pH a 7. Después se añadieron 100  $\mu$ l de PBS, pH 6.

Se añadieron 200  $\mu$ l de la solución de <sup>68</sup>Ga preconcentrada y tamponada a 100  $\mu$ g (en 100  $\mu$ l) del conjugado quelante C2Ac-(7). A intervalos de 5 minutos, se pusieron 2  $\mu$ l de la mezcla sobre ITLC-SG y el cromatograma desarrollado usando tampón citrato 0,1 M como fase móvil.

La unión de C2Ac-(7) radiomarcado a PS sobre glóbulos rojos (RBC) se realizó de acuerdo con un método de la bibliografía (véase Tait, J. F., Gibson, D. F., y Smith, C. (2004) Measurement of the affinity and cooperativity of annexin V- membrane binding under conditions of low membrane occupancy. Anal. Biochem.329, 112-119). Se obtuvo una preparación comercial de RBC humano conservado de Beckman-Coulter (High Wycombe, RU). Las titulaciones de calcio de RBC se realizaron en un tampón de HEPES-sodio 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, NaN<sub>3</sub> 3 mM, con 1 mg/ml de BSA como proteína portadora. Las reacciones se prepararon con C2AcH 1 nM marcado con <sup>68</sup>Ga y calcio; Después se añadió RBC y la reacción (1 ml) se incubó durante 8 min a TA.

Después, las células se centrifugaron (3 min a 7500 RCF), el sobrenadante se retiró y las células se volvieron a suspender en 1 ml de tampón de ensayo que contenía la misma concentración de calcio utilizada durante la etapa de incubación. Las células se centrifugaron de nuevo, el sobrenadante se retiró y el microgránulo se volvió a suspender en 0,7 ml de tampón de ensayo más ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 10 mM para liberar C2Ac-(7) marcado con  $^{68}\text{Ga}$  unido de manera dependiente del calcio. Después de la centrifugación para retirar el RBC, se midió el C2Ac-(7) marcado liberado en el sobrenadante usando un contador gamma. El  $\text{CE}_{50}$  se calculó como se describe en la bibliografía usando la ecuación  $Y = [\text{Ca}]^N / ([\text{Ca}]^N + \text{EC}_{50}^N)$  en la que  $Y = B/B_{\text{máx}}$ , B es la cantidad observada de proteína radiomarcada unida a una concentración dada de calcio y  $B_{\text{máx}}$  es la concentración de proteína radiomarcada unida a concentraciones saturadas de calcio.

El ajuste de la curva se realizó usando una curva no lineal ajustada por una rutina basada en el algoritmo de Levenberg-Marquardt usando Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, Estados Unidos).

#### **Ejemplo 8 - escaneado TEP y biodistribución en ratones con conjugado de $^{68}\text{Ga}$ -C2Ac**

En las figuras 6a y 6b se muestran las imágenes TEP tomadas 1,5 horas tras la inyección en ratones del conjugado de  $^{68}\text{Ga}$ -C2Ac-(7) y el  $^{68}\text{Ga}$  no quelado ("libre"), respectivamente. La presencia de  $^{68}\text{Ga}$  se muestra con áreas en blanco claro en la imagen. La inyección del conjugado de  $^{68}\text{Ga}$ -C2Ac-(7) mostró la rápida eliminación de la radioactividad en la sangre y los tejidos, con una absorción casi exclusiva en el riñón y una pequeña cantidad de actividad excretada al bazo (figura 6a). Esto se diferencia de las imágenes obtenidas con la inyección de  $^{68}\text{Ga}$  "libre", en las que se vio cómo la actividad se iba eliminando lentamente de la sangre hasta predominantemente remodelar el hueso (figura 6b).

Tabla 10 - porcentaje de radioactividad inyectada por gramo en los tejidos de ratón 90 minutos después de la inyección del conjugado de  $^{68}\text{Ga}$ -C2Ac-(7).

	<b>Media (n=4)</b>	<b>Desv. std.</b>
<b>Bazo</b>	0,46	0,11
<b>Estómago</b>	0,77	0,31
<b>Intestino</b>	0,42	0,06
<b>Intestino ciego</b>	0,34	0,05
<b>Hígado</b>	0,94	0,15
<b>Sangre</b>	0,33	0,18
<b>Riñones</b>	155,29	27,21
<b>Timo</b>	0,27	0,09
<b>Corazón</b>	0,47	0,15
<b>Pulmones</b>	0,63	0,15
<b>Músculo</b>	0,39	0,23
<b>Fémur (I)</b>	0,40	0,10
<b>Rabo</b>	0,85	0,29

#### **Detalles experimentales**

El conjugado de  $^{68}\text{Ga}$  marcado con C2Ac-(7) se sintetizó tal y como se ha descrito anteriormente. El  $^{68}\text{Ga}$  no quelado en la solución tamponada se preparó usando el método de preconcentración (y la solución tamponada a 7 pH) descrito en el ejemplo 7. Se realizó el análisis de CCF (cromatografía en capa fina). No se detectó precipitado de hidróxido de galio en el momento de la inyección. Las soluciones para la inyección se filtraron a través de un filtro de  $0,22 \mu\text{m}$  y se inyectaron en las venas del rabo de los ratones hembra C57B/6 ( $n=4$ , 10 10 MBq en  $100 \mu\text{l}$  para cada animal). Los escáneres TEP/TC se adquirieron 90 minutos después de la inyección usando un escáner NanoPET/CT (Bioscan, París, Francia) con un tiempo de adquisición TEP de 1800 s, proporción de coincidencia: 1-3. Reconstrucción de imágenes: OSEM con SSRB 2D LOR, ventana de energía: 400-600 keV, filtro: punto de corte Ramlak 1, número de repeticiones/subconjuntos: 8/6. Los animales se sacrificaron en 90 minutos y los órganos explantados se contaron en un contador gamma para determinar la biodistribución.

#### **Ejemplo 9 - Marcaje del CP256 con $^{68}\text{Ga}$ en suero**

La figura 7 muestra la radiocromatografía de exclusión por tamaño (columna PD10) de la quelación del  $^{68}\text{Ga}$  por el CP256 en suero y los experimentos de control que muestran el cloruro de  $^{68}\text{Ga}$  incubado en suero; el complejo de  $^{68}\text{Ga}$ -CP256-(7) preformado incubado con suero y el  $^{69}\text{Ga}$  incubado en solución tamponada.

Como medición de la eficacia de la quelación del  $^{68}\text{Ga}$  con CP256, y para demostrar la viabilidad del enfoque de predirecciónamiento descrito anteriormente, el marcaje se llevó a cabo en suero, presentando de esta forma el proceso de quelación una exposición a la transferrina en suero. La adición del cloruro de  $^{68}\text{Ga}$  en una mezcla de CP256 y suero proporcionó un cromatograma por exclusión de tamaño similar al de  $^{68}\text{Ga}$ -CP256 cuando la

concentración de la muestra de CP256 era de 23  $\mu\text{M}$  o más, mientras que solo la adición de  $^{68}\text{Ga}$  al suero proporcionó un cromatograma coherente con una mezcla de complejo de  $^{68}\text{Ga}$ -transferrina y galio "libre". Esto muestra que el CP256 compete eficazmente con la transferrina en suero. Además, si el  $^{68}\text{Ga}$  se equilibraba primero con suero, y después se añadía el CP256, volvía a observarse un cromatograma similar al de  $^{68}\text{Ga}$ -CP256, mostrando que el CP256 es capaz de extraer el  $^{68}\text{Ga}$  del complejo  $^{68}\text{Ga}$ -transferrina. La precipitación de etanol y los experimentos de CCFI (cromatografía en capa fina instantánea) confirmaron que en el suero que contenía CP256 no existía unión a la proteína cuantificable ni  $^{68}\text{Ga}$  libre detectable. Todo el  $^{68}\text{Ga}$  permaneció al principio en la CCFI de los sobrenadantes. Estas observaciones sugieren que los conjugados de  $^{68}\text{Ga}$  y CP256 podrían usarse en un modo de "predireccionamiento" novedoso *in vivo*, en el que se administra un conjugado de CP256 dirigido y se permite que se fije a una diana, seguido de la inyección de  $^{68}\text{Ga}$  para localizar el CP256 predirigido.

#### Detalles experimentales

Se usaron dos técnicas diferentes de radiomarcaje. En el método 1, 100  $\mu\text{l}$  de quelato (CP-256, 2,35 mM, 1,17 mM, 589  $\mu\text{M}$ , 117  $\mu\text{M}$ , 23  $\mu\text{M}$  y 11,7  $\mu\text{M}$ ; pH 7-7,5 en una solución tamponada de PBS/bicarbonato) se mezclaron con 300  $\mu\text{l}$  de suero humano. Tras 10-15 minutos, se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de eluato de  $^{68}\text{Ga}$  y la solución se incubó a 37  $^{\circ}\text{C}$  en un tubo de plástico. En el segundo método, se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de solución de  $^{68}\text{Ga}$  a los 300  $\mu\text{l}$  de suero de sangre humana. Tras 15-20 minutos, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de quelato (Cp-256). En cada momento, se aplicaron 50  $\mu\text{l}$  de la solución de incubación a la parte superior de la columna PD-10 y la columna con PBS se eluyó recogiendo fracciones de 0,5 ml. Las fracciones se contaron en un contador gamma (contador gamma automático 31480 Wizard de Perkin Elmer, 10 segundos por muestra). La solución incubada también se analizó con precipitación de etanol, contando las pellas y el sobrenadante tras la centrifugación para determinar la unión del  $^{68}\text{Ga}$  a la proteína, y los sobrenadantes centrifugados se analizaron mediante CCFI-GS (cromatografía en capa fina instantánea-gel de sílice) con citrato de sodio 0,1 M como fase móvil. En estas condiciones, el  $^{68}\text{Ga}$  "libre" migra con el frente del disolvente ( $R_f=1$ ) y el  $^{68}\text{Ga}$ -CP256 permanece en el origen ( $R_f=0$ ).

#### Ejemplo 10 - Marcaje del CP256 con $^{111}\text{In}$

El cloruro- $^{111}\text{In}$  formó un complejo con el CP256 (589  $\mu\text{M}$ ) a aproximadamente 90 % de rendimiento tras 5 minutos, como se determinó en el CCFI-GS (HSA). El complejo mostró <2 % de liberación de  $^{111}\text{In}$  o unión a las proteínas de suero cuando se incubó en suero humano durante 2 horas, como se determinó mediante la cromatografía por exclusión de tamaño PD10 (figura 8).

#### Detalles experimentales

Se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de solución tamponada de alícuota de acetato (pH=6) en el vial que contenía  $^{111}\text{InCl}_3$  (7MBq, Mallinckrodt Medical) en HCL. Se preparó una solución de 589  $\mu\text{M}$  de CP256 disolviendo 0,5 mg de CP256 en 1 ml de PBS. Se mezclaron 100  $\mu\text{l}$  del alícuota de esta solución de CP256 con 50  $\mu\text{l}$  de la solución de  $^{111}\text{In}$ . Tras la incubación durante 5 minutos, la especiación de  $^{111}\text{In}$  se analizó usando tiras de CCFI-GS que habían sido saturadas anteriormente con albúmina de suero humano (HSA) y se secaron. Los cromatogramas se desarrollaron con agua, etanol y amoniaco en un intervalo de 5:2:1. En estas condiciones el  $^{111}\text{In}$  sigue en el origen mientras que el  $^{111}\text{In}$ -CP256 se mueve hacia el frente del disolvente.

#### Ejemplo 11 - Obtención de imágenes *in vivo* del conjugado del anticuerpo-CP256 mediante el modo de predireccionamiento con $^{67}\text{Ga}$

Un anticuerpo de IgG monoclonal, SER4, frente a un antígeno de sialoadhesina expresado por los macrófagos proinflamatorios, se conjugó con CP256-maleimido (7), reduciendo en primer lugar los enlaces de disulfuro de anticuerpos con 2-mercaptoetanol, y después tratando los grupos triol formados de este modo con CP256-maleimido (7) para proporcionar CP256-SER4.

La biodistribución típica en los ratones del SER4 marcado con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (datos no publicados), observada anteriormente, refleja la rápida eliminación de la circulación, con una absorción predominantemente en el bazo y, en cierta medida, también en el hígado.

El CP256-SER4 se marcó con  $^{67}\text{Ga}$  para proporcionar  $^{67}\text{Ga}$ -CP256-SER4. A los grupos de ratones de tipo silvestre se les inyectó, o bien  $^{67}\text{Ga}$ -CP256-SER4 directamente marcado (grupo 1), o bien SER4 (no conjugado) y 5 minutos después  $^{67}\text{Ga}$ -citrato (grupo 2) o CP256-SER4 seguido de  $^{67}\text{Ga}$ -citrato.

Los mismos experimentos se realizaron también usando ratones nuligénicos a la sialoadhesina. Todos los animales se sacrificaron después de 3 horas y se determinó la biodistribución de la radioactividad.

Los resultados se muestran en la figura 9. Para cada órgano, los datos de biodistribución del grupo 1 se muestran en la columna de la izquierda, los datos de biodistribución del grupo 2 se muestran en la columna del centro, y los datos de biodistribución del grupo 3 se muestra en la columna de la derecha.

El grupo 1 mostró un direccionamiento fuerte del  $^{67}\text{Ga}$ -CP256-SER4 hacia el bazo (36 % DI/g), mientras que el grupo 2 mostró una absorción muy baja del  $^{67}\text{Ga}$ -cittrato en el bazo (4 % DI/g). Por otra parte, el grupo 3 mostró que la preinyección de CP256-SER4 era capaz de aumentar la absorción de  $^{67}\text{Ga}$ -cittrato del bazo de 4 % DI/g a 10 % DI/g, sugiriendo que el  $^{67}\text{Ga}$  siguió la ubicación del conjugado de anticuerpo en un grado importante.

El grupo 1 también mostró una actividad elevada del  $^{67}\text{Ga}$ -CP256-SER4 en la sangre circulante (31 % DI/g), mientras que el  $^{67}\text{Ga}$ -cittrato (grupo 2) no lo hizo (7 % DI/g). La preadministración de CP256-SER4 (grupo 3) aumentó la retención de sangre del 7 % al 16 % DI/g. Los ratones nuligénicos no mostraron el comportamiento de direccionamiento del bazo, consistente con este patrón asociado a la expresión de la sialoadhesina. Estos experimentos demuestran la viabilidad de la obtención de imágenes de bioconjugados no marcados predirigidos de CP256 mediante inyecciones tardías de  $^{67}\text{Ga}$ -cittrato.

#### Detalles experimentales

Para la conjugación de CP256 al SER4: A 2 mg (5 mg/ml) del anticuerpo SER4 en una solución salina tamponada con fosfato se añadieron 25  $\mu\text{l}$  de EDTA 50 mM. La solución resultante se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora para quelar los iones metálicos presentes en la solución.

Se lavó entonces el anticuerpo mediante centrifugación a 3000 rpm durante 3 x 15 minutos en un tubo de ultracentrifugación Vivaspin2 50.000 mwco. El anticuerpo se resuspendió entre las etapas de centrifugación y se ajustó el volumen a 2 ml mediante la adición de solución tamponada de fosfato sin metal 0,1 M, pH 7. El anticuerpo concentrado y lavado se recogió en aproximadamente 300  $\mu\text{l}$  de solución tamponada de fosfato 0,1 M.

Para la reducción del anticuerpo, se diluyó 2-mercaptoetanol (5  $\mu\text{l}$ ) hasta 20  $\mu\text{l}$  en una solución tamponada de fosfato 0,1 M, pH 7. Se añadieron 3,8  $\mu\text{l}$  (exceso de 1000 en veces) del 2-mercaptoetanol diluido al anticuerpo, y se permitió que la reducción continuase durante 30 minutos a temperatura ambiente.

El volumen se ajustó a 1 ml por adición de solución tamponada de fosfato 0,1 M y se retiró aplicando el anticuerpo reducido a una columna por exclusión de tamaño desechable (PD10). Las fracciones que contenían el anticuerpo reducido se combinaron y se añadió inmediatamente CP256-maleimido (0,77 mg disueltos en 8  $\mu\text{l}$  de DMSO, exceso de 40 en veces). La reacción de la conjugación se calentó a 37 °C durante 30 minutos. El anticuerpo del conjugado se lavó después usando un tubo de ultracentrifugación Vivaspin2 50.000 mwco como anteriormente, pero usando una solución tamponada de acetato de amonio 0,1 M, pH 6 para eliminar el ligando en exceso. El anticuerpo de CP256 concentrado se recogió en una solución tamponada de acetato de amonio 0,1 M, pH 6.

El radiomarcaje del  $^{67}\text{Ga}$  se realizó mediante la adición de 45  $\mu\text{l}$  de  $^{67}\text{Ga}$ -cittrato (0,6-0,75 MBq) a 90  $\mu\text{l}$  (90  $\mu\text{g}$ ) de CP256-SER4. Se permitió que continuara el radiomarcaje durante 10 minutos antes de la dilución a 350  $\mu\text{l}$  con solución salina tamponada de fosfato. Se prepararon inyecciones que contenían 25  $\mu\text{g}$  de anticuerpo marcado. El análisis del anticuerpo radiomarcado se realizó mediante HPLC de exclusión por tamaño usando solución tamponada de fosfato 0,1 M que contenía 2 mM de EDTA, ya que la fase móvil que aseguraba el buen radiomarcaje se había conseguido antes de la inyección en animales.

A los grupos de ratones de tipo silvestre (C57B1/6, machos de 8-10 semanas de vida, n=2 a 3 por grupo) se les inyectó, o bien  $^{67}\text{Ga}$ -CP256-SER4 directamente marcado (grupo 1), o bien SER4 (no conjugado) y 5 minutos después  $^{67}\text{Ga}$ -cittrato (grupo 2) o CP256-SER4 seguido de  $^{67}\text{Ga}$ -cittrato. La actividad del  $^{67}\text{Ga}$  y la cantidad del anticuerpo usada en cada caso fue equivalente. Los mismos experimentos se realizaron también usando ratones nuligénicos (KO a la sialoadhesina, C57B1/6, machos de 8-10 semanas de vida, n=2 a 3 por grupo). Todos los animales se sacrificaron tras 3 horas y se determinó la biodistribución de la radioactividad explantando los tejidos y pesándolos y contándolos.

#### **Ejemplo 12 - Obtención de imágenes in vivo del conjugado del anticuerpo-CP256 mediante el modo de predireccionamiento con $^{68}\text{Ga}$ .**

El SER4, conjugado con CP256-maleimido (7) tal y como se describió en el ejemplo 11, se marcó con  $^{68}\text{Ga}$ , tal y como se describió anteriormente en el ejemplo 7, para proporcionar  $^{68}\text{Ga}$ -CP256-SER4. En tres ocasiones distintas, a los grupos de ratón de tipo silvestre (C57B1/6, machos de 8-10 semanas de vida, n=2 a 3 por grupo) se les inyectó, o bien  $^{68}\text{Ga}$ -CP256-SER4 directamente marcado (grupo 1), o bien SER4 (no conjugado) y 1 hora después  $^{68}\text{Ga}$ -acetato (grupo 2) o CP256-SER4 seguido 1 hora después de  $^{68}\text{Ga}$ -acetato (grupo 3).

Todos los animales se sacrificaron 1,5 horas después de la inyección de  $^{68}\text{Ga}$  y se determinó la biodistribución de la radioactividad. Los resultados se muestran en la figura 10. Para cada órgano, los datos de biodistribución del grupo 2 se muestran en la columna de la izquierda, los datos de biodistribución del grupo 3 se muestran en la columna del centro, y los datos de biodistribución del grupo 1 se muestran en la columna de la derecha.

El grupo 1 mostró un direccionamiento fuerte del  $^{68}\text{Ga}$ -CP256-SER4 hacia el bazo (20-50% DI/g en los tres experimentos), mientras que el grupo 2 mostró una absorción muy baja del  $^{68}\text{Ga}$ -acetato en el bazo (2-5% DI/g). Por

otra parte, el grupo 3 mostró que la preinyección de CP256-SER4 era capaz de aumentar la absorción de  $^{68}\text{Ga}$ -acetato del bazo de 2-5% DI/g a 17-40% DI/g, sugiriendo que el  $^{68}\text{Ga}$  siguió la ubicación del conjugado de anticuerpo en un grado importante. Estos experimentos demuestran la viabilidad de la obtención de imágenes de bioconjugados no marcados predirigidos de CP256 mediante inyecciones tardías de  $^{68}\text{Ga}$ -acetato.

5 Se muestra la imagen NanoPET/CT de un ratón del grupo 3 en la figura 11A. Se obtuvo la imagen del ratón usando el método de predireccionamiento de la invención, usando CP256-SER4: C57B1/6 de 8 semanas de vida inyectados con CP256-SER4 seguido de Ga-68-acetato. La figura muestra la absorción dirigida del hígado/bazo. Por  
10 comparación, solo se muestra en la figura 11B un ratón inyectado con Ga-68-acetato, mostrando la retención en la sangre y la acumulación en las articulaciones.

#### Detalles experimentales

15 El anticuerpo se conjugó con CP256 como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 11. Para el radiomarcaje, se eluyó el  $^{68}\text{Ga}$  de un generador de  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  y se concentró como se describe en el ejemplo 7 para proporcionar  $^{68}\text{Ga}$ -acetato. A los 150  $\mu\text{l}$  (105  $\mu\text{g}$ ) de CP256- SER4 se añadieron 150  $\mu\text{l}$   $^{68}\text{Ga}$ -acetato (16 MBq). Se permitió que continuase la reacción del radiomarcaje durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se prepararon inyecciones que  
20 contenían 35  $\mu\text{g}$  del anticuerpo radiomarcado. El análisis del anticuerpo radiomarcado se llevó a cabo tal y como se describe en el ejemplo 11.

A los grupos de ratón de tipo silvestre (C57B1/6, machos de 8-10 semanas de vida, n=2 a 3 por grupo) se les inyectó, o bien  $^{68}\text{Ga}$ -CP256-SER4 directamente marcado (grupo 1), o bien SER4 (no conjugado) y 1 hora después  $^{68}\text{Ga}$ -acetato (grupo 2) o CP256-SER4 seguido de  $^{68}\text{Ga}$ -acetato. La actividad del  $^{68}\text{Ga}$  y la cantidad del anticuerpo  
25 usada en cada caso fue equivalente. Todos los animales se sacrificaron tras 2-3 horas y se determinó la biodistribución de la radioactividad explantando los tejidos y pesándolos y contándolos. Se escaneó un animal de cada grupo usando un escáner NanoPET/CT (Bioscan). Los escáneres se iniciaron inmediatamente tras la inyección de  $^{68}\text{Ga}$ -acetato o  $^{68}\text{Ga}$ -CP256-SER4 y continuaron durante 1,5 horas.

#### Referencias:

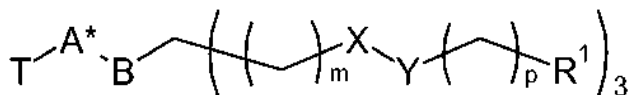
- 30
1. Emberson et al., J. Immunol. Methods. 305(2):135-51,2005
  2. Giersing et al., Bioconjug Chem. 12(6): 964-71,2001
  3. Bird et al., Science, 242; 423-426, 1988
  4. Huston et al., PNAS Estados Unidos, 85: 5879-5883, 1988
  - 35 5. Holliger et al., P.N.A.S. Estados Unidos, 90: 6444-6448, 1993
  6. Reiter et al., Nature Biotech, 14: 1239-1245, 1996
  7. Hu et al., Cancer Res., 56: 3055-3061, 1996
  8. Newkome et al., J Org Chem, 1991, 56, 7162-7167
  9. Zhou T. et al., J Med Chem. 2006, 49, 4171-4182
  - 40 10. Tavare et al., Bioconjugate Chem 2009; 20:2071-2081
  11. Tait et al., Anal. Biochem. 329, 112-119

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto bifuncional o una molécula bifuncional para uso en un método *in vivo* de diagnóstico por imagen molecular, en donde

5

(i) el compuesto bifuncional se representa por la fórmula:



10

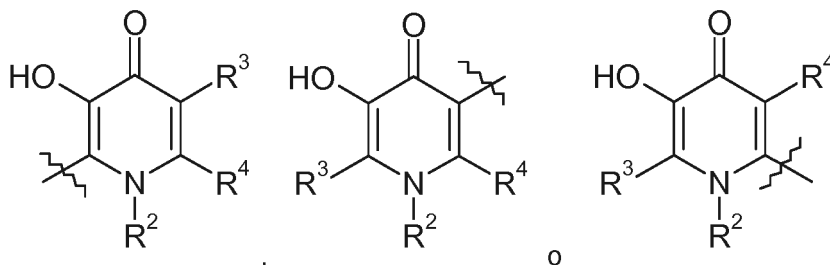
o sales del mismo;

en la que una de X e Y es C=O y la otra es NR;

en la que cada m y p se seleccionan independientemente de 0 a 6;

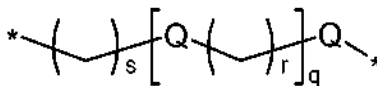
en la que R<sup>1</sup> es un grupo quelante capaz de quelar un radionúclido y se selecciona entre:

15



en las que R, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1-7</sub> opcionalmente sustituido; B es un grupo enlazador para enlazar el grupo quelante con el grupo reactivo, y se representa por la fórmula:

20



en la que Q se selecciona independientemente entre un grupo que consiste en -NR<sup>5</sup>-, -C(O)NR<sup>5</sup>-, -C(O)O-, -NR<sup>5</sup>C(O)NR<sup>5</sup>-, -NR<sup>5</sup>C(S)NR<sup>5</sup>- y -O-, cada R<sup>5</sup> es independientemente hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1-7</sub> opcionalmente sustituido, cada q y s se seleccionan independientemente de 0 a 6 y cada r se selecciona independientemente de 1 a 6;

25

A\* es un grupo reactivo reaccionado que se acopla a T, siendo T un grupo diana capaz de unirse a una diana de interés en el sujeto;

30

y en el que

(ii) la molécula bifuncional comprende un compuesto bifuncional como se ha definido anteriormente y un radionúclido unido a través de un grupo quelante del compuesto bifuncional;

y el método comprende las etapas de:

35

(a) administrar al sujeto el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional para que el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional se unan a la diana de interés; y

(b) donde se ha administrado un compuesto bifuncional, administrar al sujeto además una composición de sonda de formación de imágenes que comprende un radionúclido, de manera que el grupo quelante R<sup>1</sup> del compuesto bifuncional quela el radionúclido en la diana de interés; y

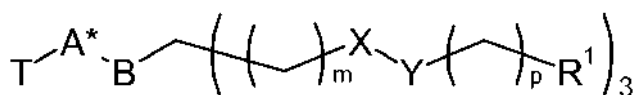
40

(c) detectar el radionúclido para la imagen de la diana de interés en el sistema biológico.

2. El compuesto bifuncional o la molécula bifuncional para uso en el método *in vivo* de diagnóstico por imagen molecular de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método *in vivo* de la obtención de imágenes moleculares es PET o SPET.

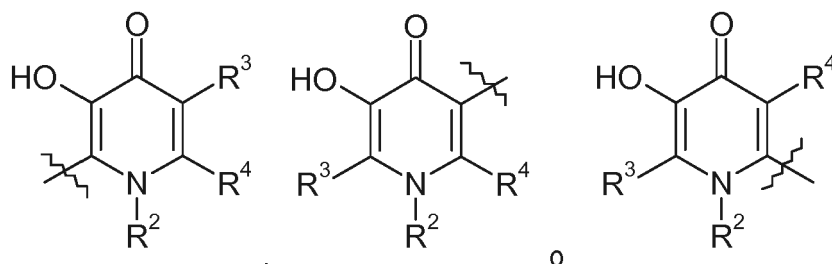
45

3. Un compuesto bifuncional o una molécula bifuncional para uso en un método de terapia con radionúclidos, en donde el compuesto bifuncional se representa por la fórmula:

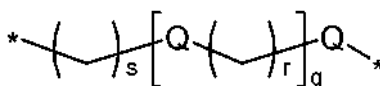


o sales del mismo;

- 5 en la que una de X e Y es C=O y la otra es NR;  
 en la que cada m y p se seleccionan independientemente de 0 a 6;  
 en la que R<sup>1</sup> es un grupo quelante capaz de quelar un radionúclido y se selecciona entre:



- 10 en la que R, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son independientemente hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1-7</sub> opcionalmente sustituido;  
 B es un grupo enlazador para enlazar el grupo quelante con el grupo reactivo y se representa por la fórmula:

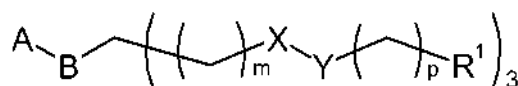


- 15 en la que Q se selecciona independientemente de entre un grupo que consiste en -NR<sup>5</sup>-, -C(O)NR<sup>5</sup>-, -C(O)O-, -NR<sup>5</sup>C(O)NR<sup>5</sup>-, -NR<sup>5</sup>C(S)NR<sup>5</sup>- y -O-, cada R<sup>5</sup> es independientemente hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1-7</sub> opcionalmente sustituido, cada q y s se seleccionan independientemente de 0 a 6 y cada r se selecciona independientemente de 1 a 6;
- 20 A\* es un grupo reactivo reaccionado que se acopla a T, siendo T un grupo diana capaz de unirse a una diana de interés en el sujeto;  
 y en el que la molécula bifuncional comprende un compuesto bifuncional como se ha definido anteriormente y un radionúclido capaz de suministrar radioterapia a la diana de interés y unido a través de un grupo quelante del compuesto bifuncional;
- 25 y el método comprende las etapas de:

- (a) administrar al sujeto el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional para que el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional se unan a la diana de interés; y  
 (b) en donde se ha administrado un compuesto bifuncional, administrar al sujeto además una composición, comprendiendo la composición un radionúclido capaz de administrar radioterapia al blanco de interés, de manera que el grupo quelante R<sup>1</sup> del compuesto bifuncional quela el radionúclido en la diana de interés.

4. Un precursor del compuesto bifuncional, un compuesto bifuncional o una molécula bifuncional, en donde:

- 35 (a) el precursor del compuesto bifuncional se representa por la fórmula:



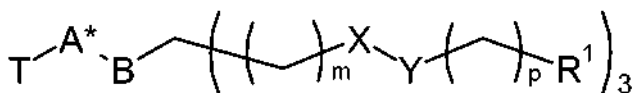
o sales del mismo;

- 40 en la que:

- (i) X es NR e Y es C=O, m se selecciona de 0 a 6 y p se selecciona de 1 a 6; o  
 (ii) Y es NR y X es C=O, y m y p se seleccionan independientemente de 0 a 6;

- 45 en la que R<sup>1</sup> y B son como se define en la reivindicación 1;  
 A es un grupo reactivo para acoplamiento a un grupo diana capaz de unirse a una diana de interés en el sujeto;  
 (b) el compuesto bifuncional se representa por la fórmula:





o sales del mismo;  
en la que:

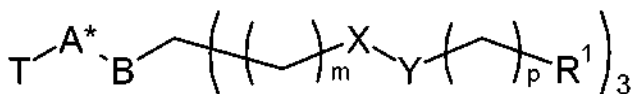
5

- (i) X es NR e Y es C=O, m se selecciona de 0 a 6 y p se selecciona de 1 a 6; o
- (ii) Y es NR y X es C=O, y m y p se seleccionan independientemente de 0 a 6;

en la que R<sup>1</sup>, B y A\* son como se definen en la reivindicación 1; y

10

(c) la molécula bifuncional comprende un compuesto bifuncional y un radionúclido unido a través de un grupo quelante del compuesto bifuncional, en donde el compuesto bifuncional de la molécula bifuncional se representa por la fórmula:



15

o sales del mismo;

en la que una de X e Y es C=O y la otra es NR;

en la que cada m y p se seleccionan independientemente de 0 a 6;

20

en la que R<sup>1</sup>, B, A\* y T son como se definen en la reivindicación 1.

5. El compuesto bifuncional o la molécula bifuncional para uso en el método *in vivo* de diagnóstico por imagen molecular de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional para uso en un método de terapia con radionúclidos de acuerdo con la reivindicación 3, o el precursor del compuesto bifuncional, el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional de acuerdo con la reivindicación 4, en donde s se selecciona independientemente de 0 a 6, cada r se selecciona independientemente de 1 a 6 y q se selecciona de 1 a 6.

25

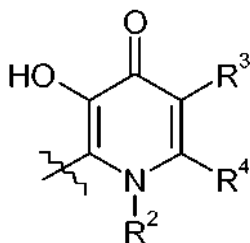
6. El compuesto bifuncional o la molécula bifuncional para uso en el método *in vivo* de diagnóstico por imagen molecular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5, el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional para uso en el método de terapia con radionúclidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 5, o el precursor del compuesto bifuncional, el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde el grupo reactivo A es un grupo funcional reactivo con la proteína y, opcionalmente, el grupo reactivo se selecciona del grupo que consiste en una maleimida, aldehído, éster, hidrazina, derivado de hidrazina, alcoxiamina, derivado de alcoxiamina, alquino, alqueno y grupo azida.

30

35

7. El compuesto bifuncional o la molécula bifuncional para uso en el método *in vivo* de diagnóstico por imagen molecular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 o 6, el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional para uso en el método de terapia con radionúclidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 o 6, o el precursor del compuesto bifuncional, el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde R<sup>1</sup> es

40

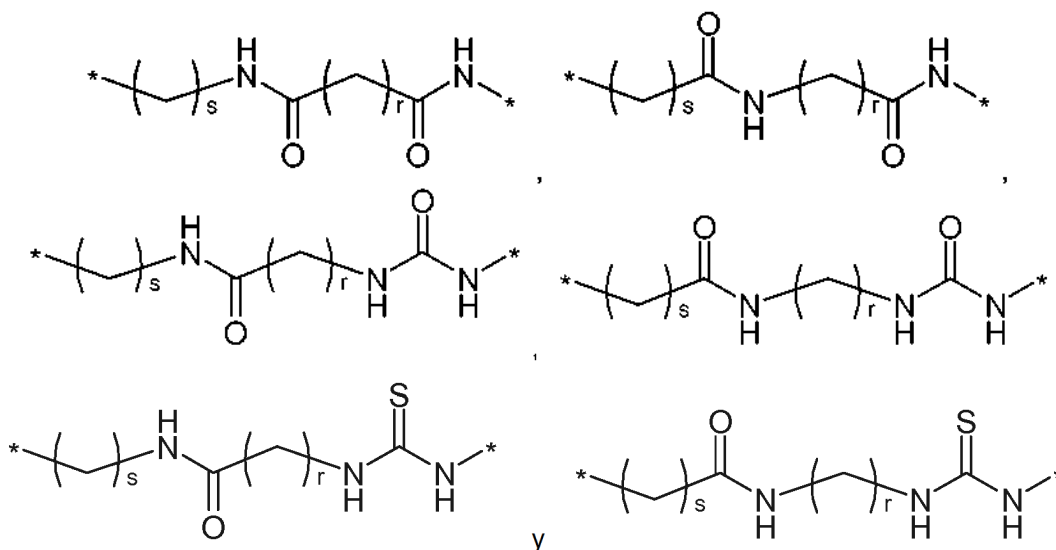


45

y R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son como se definen en la reivindicación 1, y en particular son independientemente H o CH<sub>3</sub>

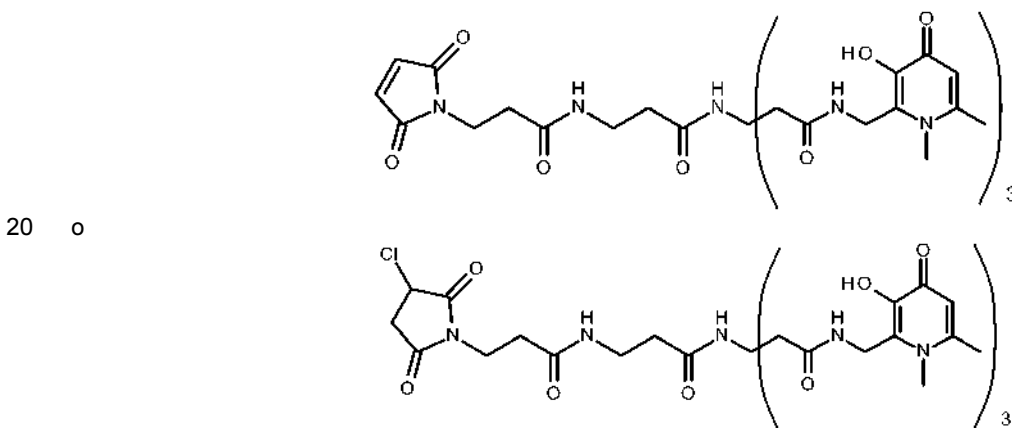
8. El compuesto bifuncional o la molécula bifuncional para uso en el método *in vivo* de diagnóstico por imagen molecular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5 a 7, el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional para uso en el método de terapia con radionúclidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 5 a 7, o el precursor del compuesto bifuncional, el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde B se representa por una de las siguiente fórmulas:

50



5 9. El compuesto bifuncional o la molécula bifuncional para uso en el método *in vivo* de diagnóstico por imagen molecular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5 a 8, el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional para uso en el método de terapia con radionúclidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 5 a 8, o el precursor del compuesto bifuncional, el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, m es 2 y p es 1.

10. El compuesto bifuncional o la molécula bifuncional para uso en el método *in vivo* de diagnóstico por imagen molecular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5 a 9, el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional para uso en el método de terapia con radionúclidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 5 a 9, o el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, que comprende un compuesto bifuncional o una molécula bifuncional, obtenibles a partir de un precursor de compuesto bifuncional representado por la fórmula:



25 11. El compuesto bifuncional o la molécula bifuncional para uso en el método *in vivo* de diagnóstico por imagen molecular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5 a 10, el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional para uso en el método de terapia con radionúclidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 5 a 10, o el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, en donde el grupo diana y la diana de interés son un receptor y un ligando, o un anticuerpo y un antígeno, o una sonda metabólica, por ejemplo, transportador de glucosa/glucosa, hipoxia/resto sensible a hipoxia, o mineral de hueso/bisfosfonato, o avidina (o estreptavidina o proteína relacionada)/biotina o un derivado similar a biotina, o ARN/ARN antisentido y, opcionalmente, en donde el grupo diana es un péptido, una proteína, un anticuerpo, un aptámero o un ligando de molécula pequeña capaz de unirse a un compañero de unión en la diana de interés y además, opcionalmente, en donde el grupo diana incluye Anexina V y el dominio C2 de una sinaptotagmina, TIMP-2, CEA, péptido RGD, péptido de direccionamiento del receptor de somatoestatina, bombesina, gastrina o péptido de direccionamiento de VCAM.

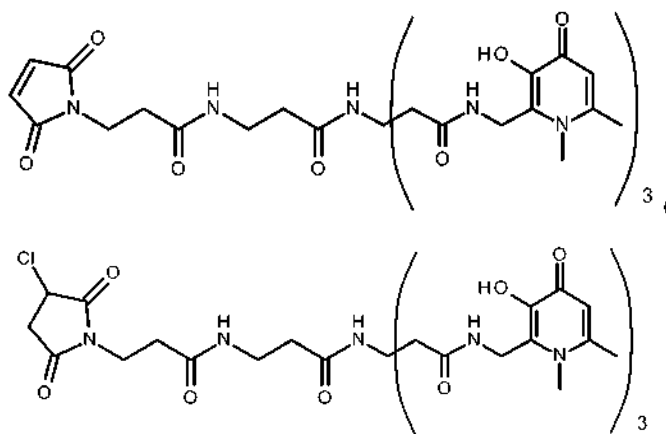
35 12. El compuesto bifuncional o la molécula bifuncional para uso en el método *in vivo* de diagnóstico por imagen

molecular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5 a 11, el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional para uso en el método de terapia con radionúclidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 5 a 11, o el compuesto bifuncional o la molécula bifuncional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, en donde la diana de interés es un ligando o un receptor expresado en células o tejido enfermos, un antígeno de superficie celular asociado a un estado de enfermedad, marcadores tumorales, tales como un marcador específico de cáncer, o un marcador específico de tejido, o la diana de interés es una ubicación, un órgano, un tipo de tejido, un agente infeccioso o una propiedad fisiológica en un sujeto sometido a la obtención de imagen molecular.

10 13. La molécula bifuncional para uso en el método *in vivo* de diagnóstico por imagen molecular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5 a 12, la molécula bifuncional para uso en el método de terapia con radionúclidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 5 a 12, o la molécula bifuncional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 12, en donde el radionúclido es un isótopo de escandio, hierro, cobalto, cobre, galio, itrio, circonio, tecnecio, indio, estaño, renio, gadolinio, terbio, holmio, bismuto 213 o lutecio, opcionalmente en donde el radionúclido es un isótopo de galio, Ga- 68, Ga-67 o Bi-213.

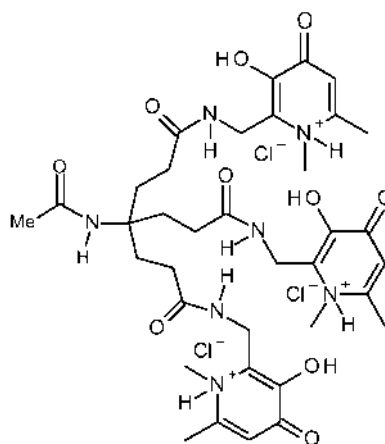
14. El precursor de compuesto bifuncional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en donde el precursor del compuesto bifuncional se representa por las fórmulas:

20  
o



25 15. Un kit para su uso en un método de diagnóstico por imagen molecular *in vivo* o para su uso en un método de terapia con radionúclidos, comprendiendo el kit: una composición de compuesto bifuncional que tiene un compuesto bifuncional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13; y una composición que comprende un radionúclido.

30 16. Un complejo de ligando de galio en donde el complejo de ligando de galio comprende un ligando representado por la siguiente fórmula:



35 y  
un isótopo de galio complejado al ligando.

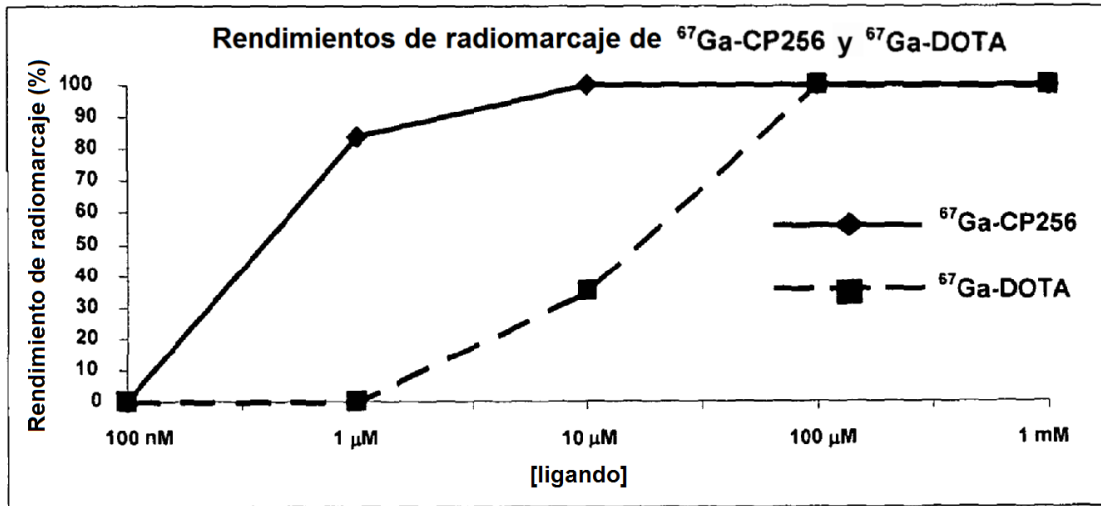


Figura 1

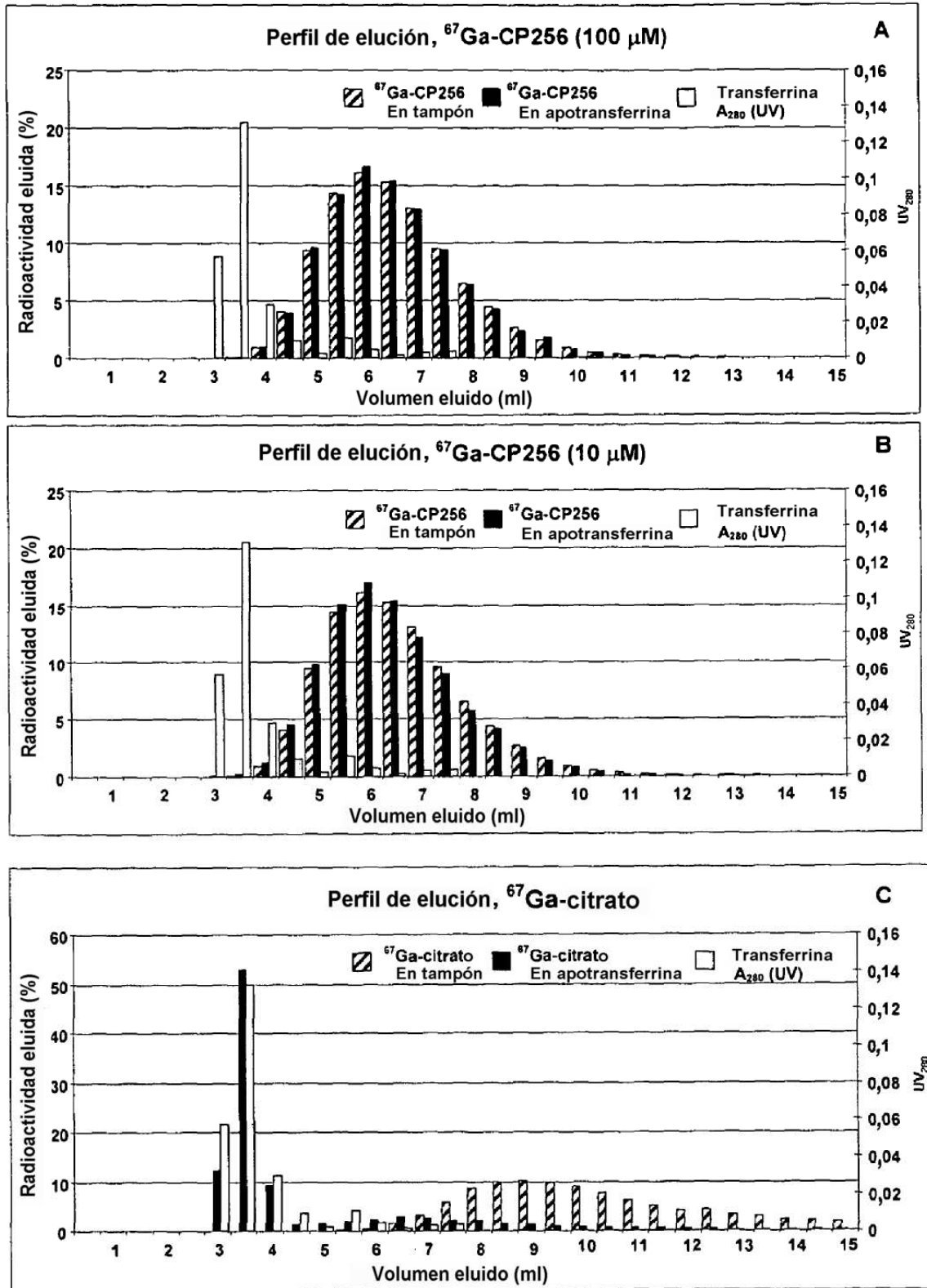


Figura 2

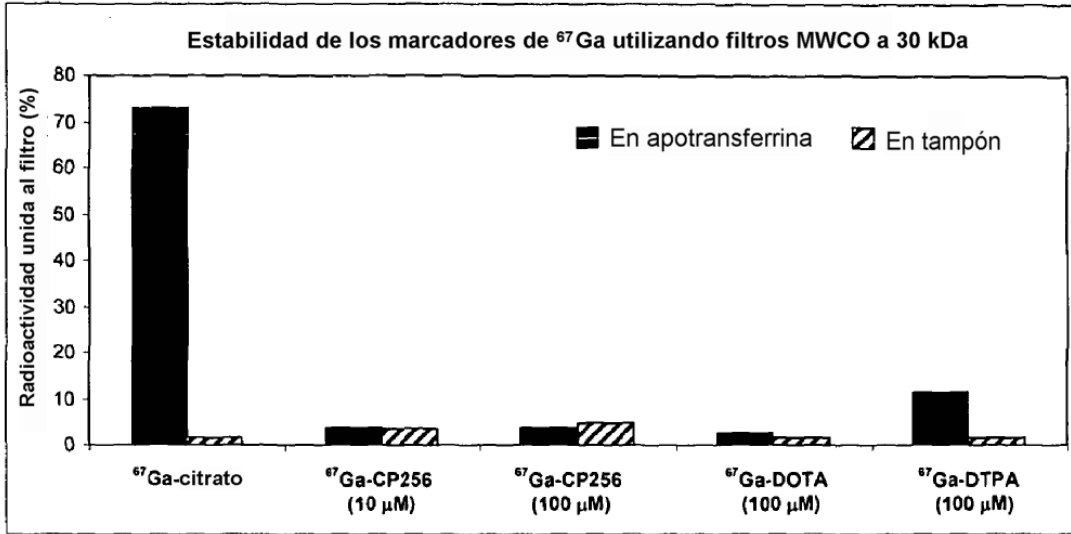


Figura 3

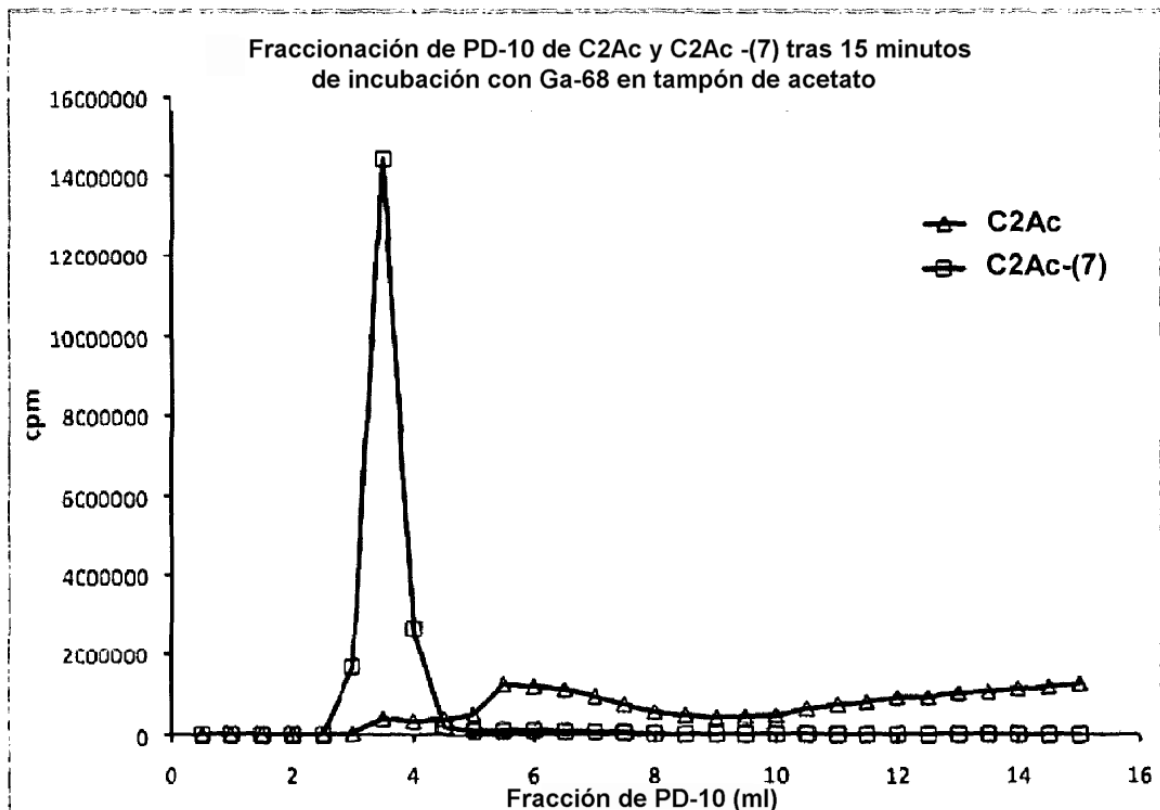


Figura 4

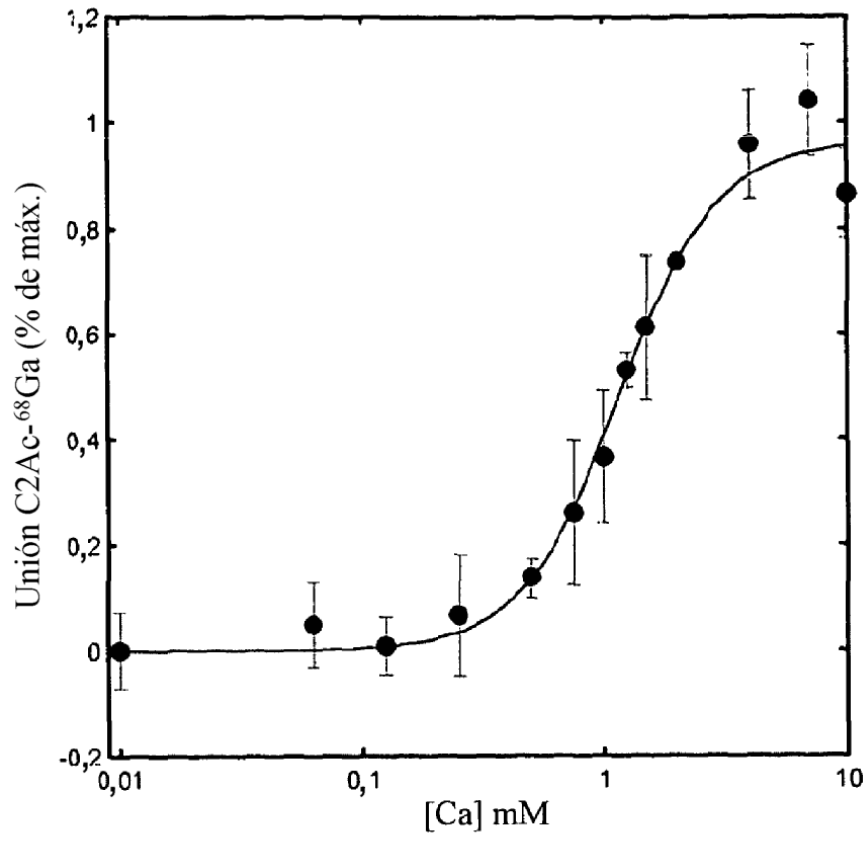


Figura 5

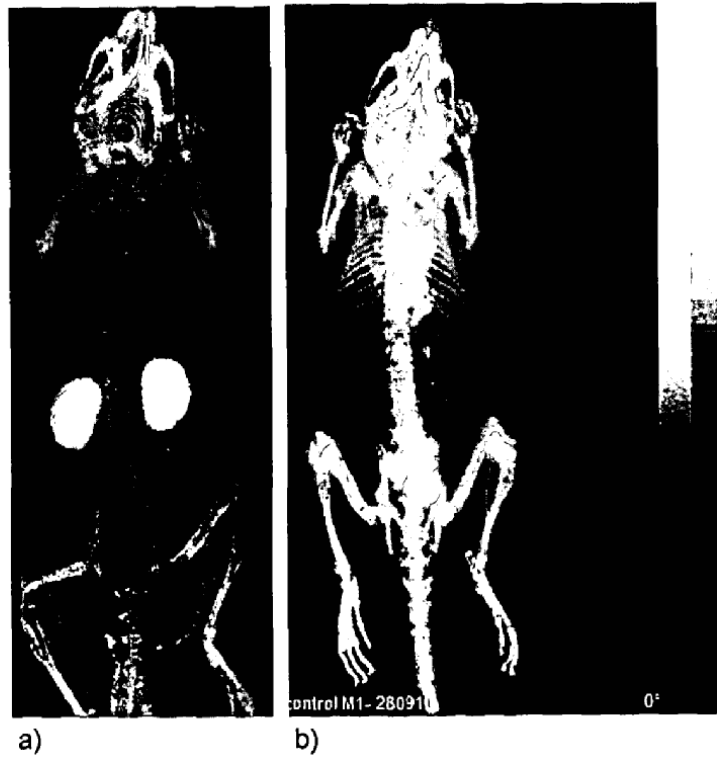


Figura 6

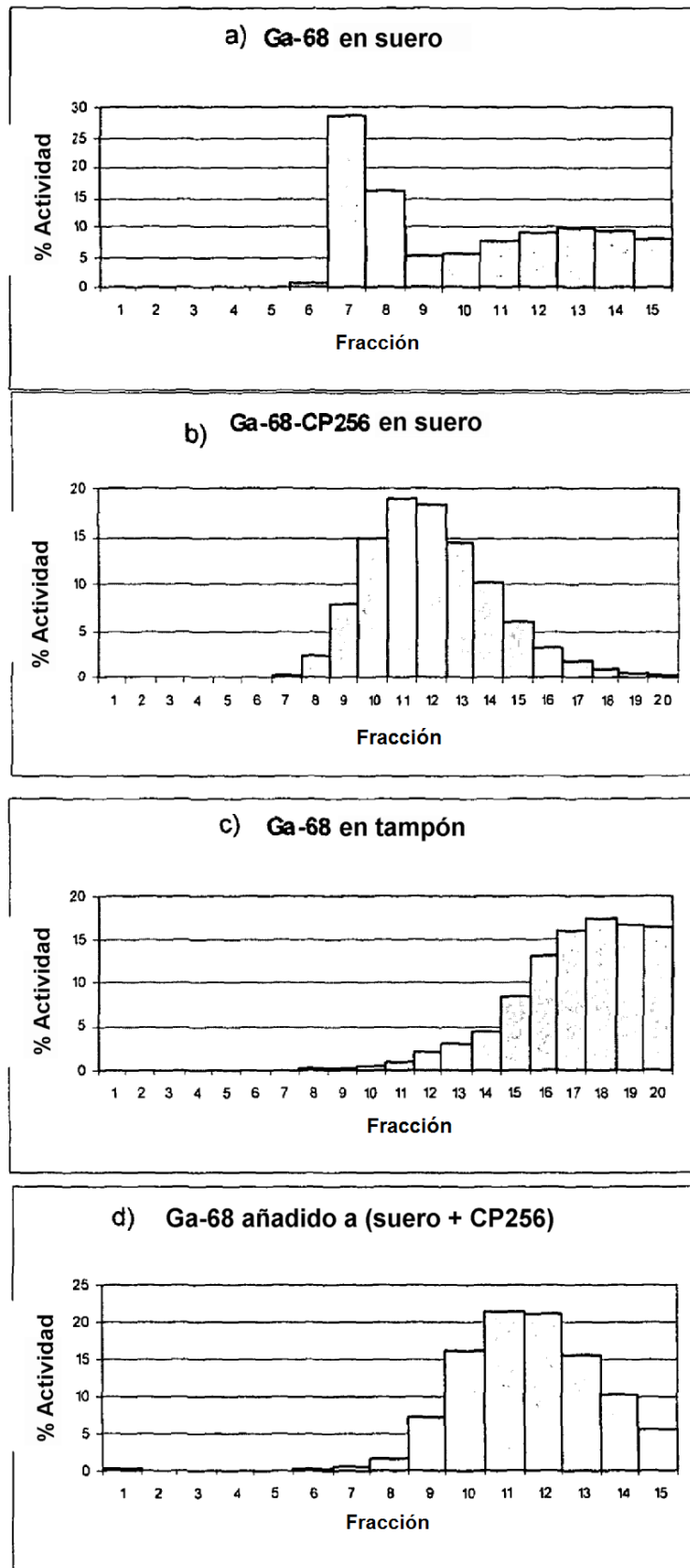


Figura 7



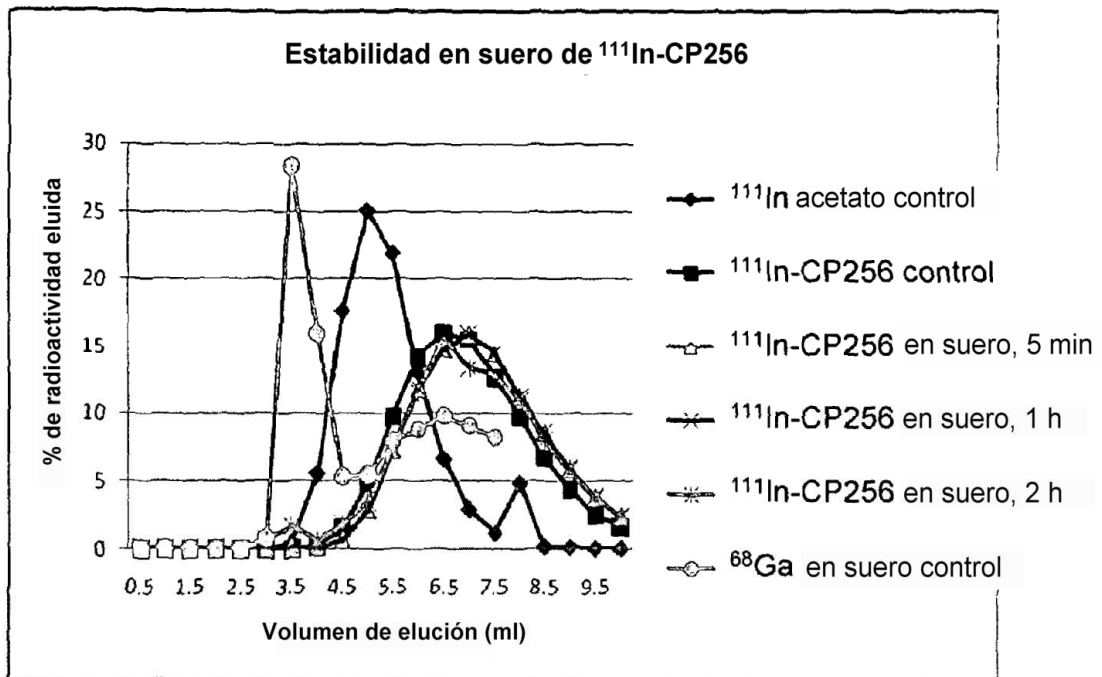
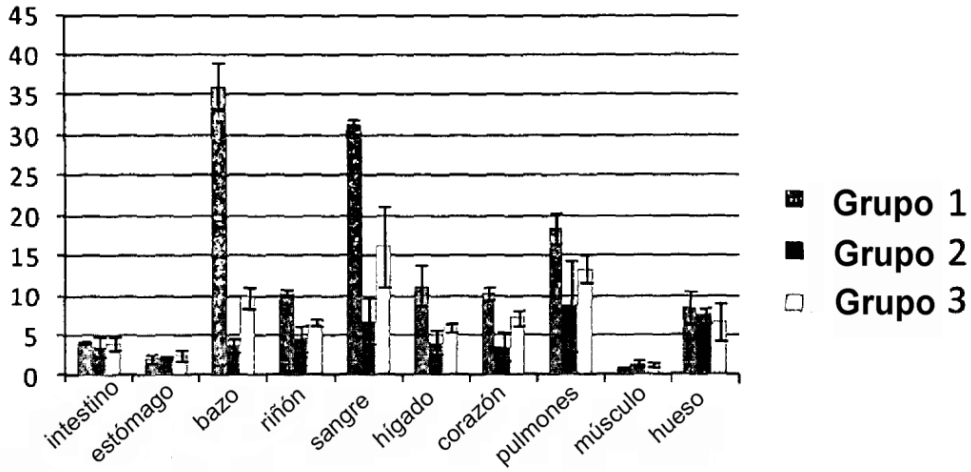
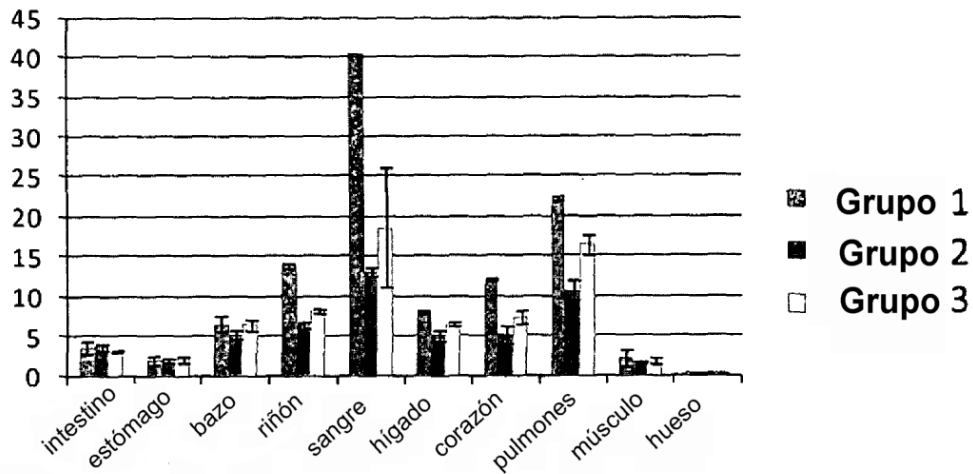


Figura 8

**Predireccionamiento de SER4-YM103 Ga-67 en TS**

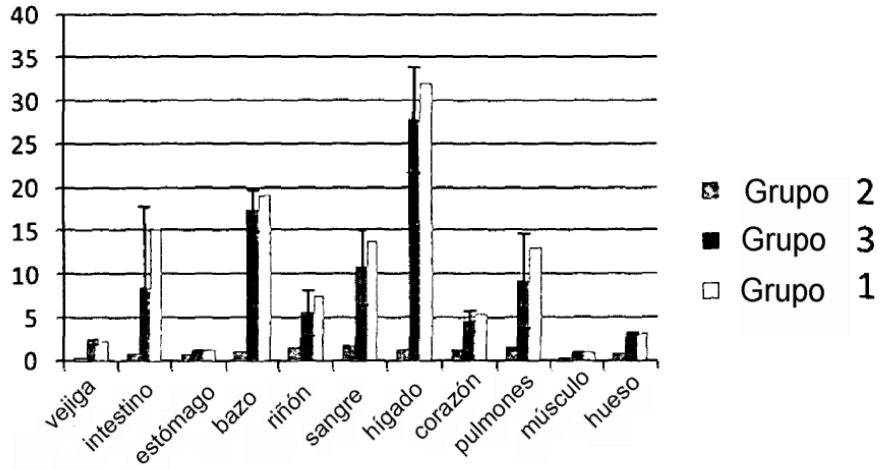


**Predireccionamiento de SER4-YM103 Ga-67 en KO**

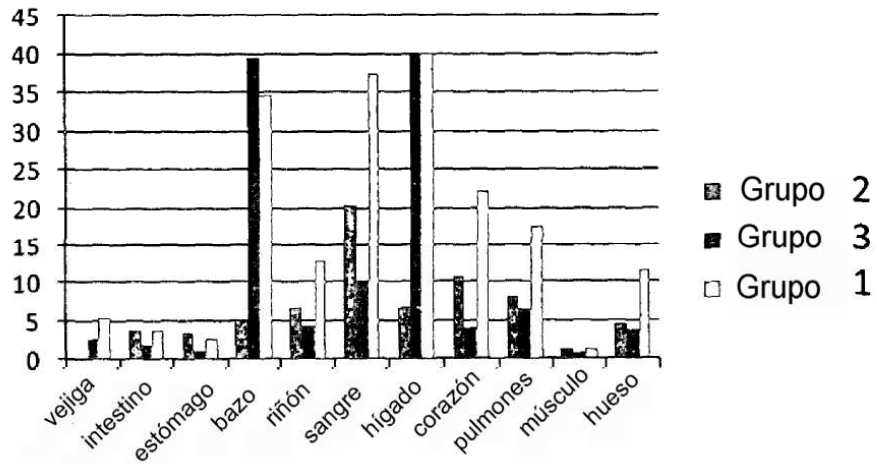


**Figura 9**

**Experimento 1 datos de biodistribución**



**Experimento 2 datos de biodistribución**



**Experimento 3 datos de biodistribución**

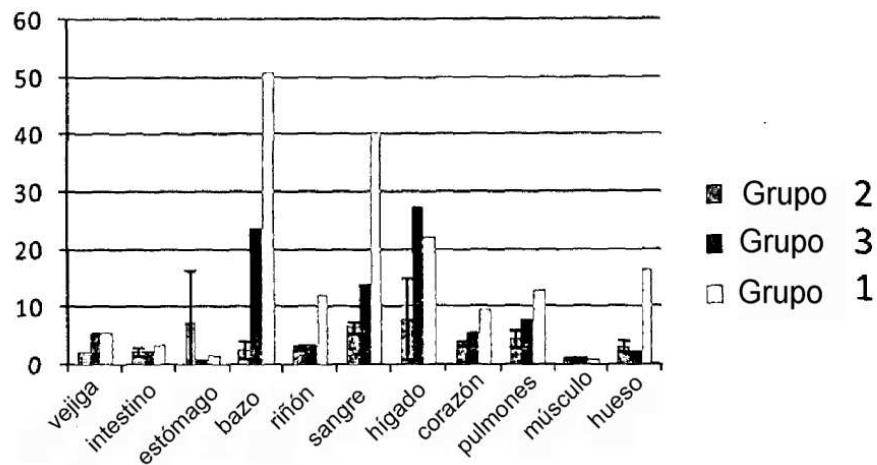


Figura 10

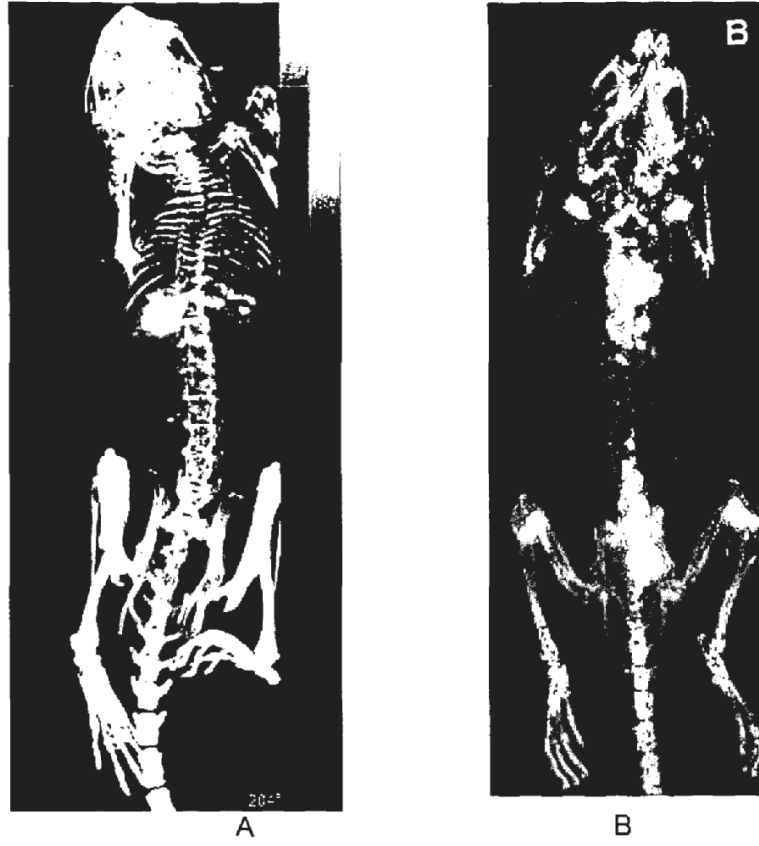


Figura 11