

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 495**

51 Int. Cl.:

A61K 51/08 (2006.01)

C07B 59/00 (2006.01)

A61K 101/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2008 PCT/EP2008/067413**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.07.2009 WO09080561**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2008 E 08865548 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2231201**

54 Título: **Radiomarcación selectiva de biomoléculas**

30 Prioridad:

20.12.2007 US 961108

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

06.04.2018

73 Titular/es:

**GENERAL ELECTRIC COMPANY (50.0%)
1 River Road
Schenectady, NY 12345, US y
GE HEALTHCARE LIMITED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PADILLA DE JESUS, OMayra Liz;
KOVACS, ERNEST WILLIAM;
GLASER, MATTHIAS EBERHARD;
ARSTAD, ERIK y
SYUD, FAISAL AHMED**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 662 495 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Radiomarcación selectiva de biomoléculas

Antecedentes

5 Los métodos para introducir átomos de flúor, en particular átomos de flúor radiactivo en biomoléculas que comprenden restos aminoacídicos, tienen un interés considerable. Sin embargo, ya que los átomos de flúor radiactivo, tales como ^{18}F , tienen una vida útil relativamente breve de aproximadamente 110 minutos, se requieren métodos que no duren mucho para introducir radioflúor en las biomoléculas.

Hay una necesidad continua de métodos eficaces y específicos de sitio para introducir uno o varios átomos de flúor, entre ellos los átomos de flúor radiactivos, en las biomoléculas.

10 **Breve descripción**

La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier información que caiga fuera del alcance de las reivindicaciones es sólo para información.

15 En un aspecto, se describen métodos para introducir el átomo de flúor en una biomolécula, tal como un polipéptido. Los métodos podrían comprender: (i) dotar de un conector que comprende un extremo que reacciona con tiol y un extremo que reacciona con alquino/azido; (ii) hacer reaccionar el extremo que reacciona con tiol del conector con una biomolécula que incluye al menos un grupo tiol o un derivado reactivo del mismo; y (iii) posteriormente hacer reaccionar el extremo que reacciona con alquino/azido del conector con una azida o un alquino, sustituido con flúor, respectivamente.

20 Aún en otro aspecto, se dan a conocer bioconjugados que comprenden unidades estructurales derivadas de (i) una biomolécula que comprende al menos un grupo tiol; y (ii), un conector. El conector se podría preparar mediante un método que comprende hacer reaccionar un compuesto amina que comprende un grupo funcional que reacciona con alquino o azido con un ácido carboxílico o un éster activado que comprende un grupo funcional que reacciona con tiol.

En otro aspecto, se da a conocer la composición de los conectores.

25 **Figuras**

Estos aspectos, y ventajas, de la presente invención se conocerán mejor cuando se lea la siguiente descripción detallada con referencia a los dibujos que la acompañan, en los que los caracteres similares representan partes similares a lo largo de los dibujos, en donde

30 En la figura 1 se muestra el análisis por HPLC de una mezcla de reacción del sistema sin optimizar que muestra el anticuerpo anti-Her2 marcado con ^{18}F -clic (27) (a, canal de radiactividad; b, canal de UV a 280 nm).

En la figura 2 se muestra el análisis por HPLC de una mezcla de reacción que contiene 2- ^{18}F fluoroetilazida (11) con el uso del gradiente I, UV a 216 nm (a, canal de radiactividad, 2- ^{18}F fluoroetilazida (11) a 3:51 min; b, canal de UV). El producto destilado muestra solo la presencia de la 2- ^{18}F fluoroetilazida (11) (c, canal de radiactividad; d, canal de UV).

35 En la figura 3 se muestra el gráfico de HPLC del rendimiento radioquímico del producto triazólico (17) formado a diferentes temperaturas y concentraciones de alquino (16) mediante el uso del compuesto de modelo (16) y la 2- ^{18}F fluoroetilazida (11).

En la figura 4 se muestran los datos de MALDI-TOF MS de un anticuerpo alquilado (22).

40 En la figura 5 se muestra el gel de proteínas por SDS-PAGE de un conjugado clic entre el anticuerpo alquilado (22) y el azido-PEG marcado con Cy5 (25a). Se observa la emisión de fluorescencia del colorante Cy5 a una masa molecular esperada del producto conjugado (26) cuando está en presencia de la fuente de Cu^1 y de reductor. No se observa la presencia del producto conjugado en ausencia de alguno de estos en los experimentos de control.

Descripción detallada

45 Para describir y hacer hincapié de manera más clara y más concisa la materia que es objeto de la invención reivindicada, se dan a conocer las siguientes definiciones para determinados términos que se utilizan en la siguiente descripción y en las reivindicaciones adjuntas a ésta. Las formas singulares «un», «una» y «el» incluyen los referentes en plural, a menos que el contexto lo dicte claramente de otra manera.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «grupo activador» hace referencia a cualquier grupo que hace que un grupo carbonilo reaccione más con los nucleófilos, por ejemplo, *N*-hidroxisuccinimida, sulfo-*N*-

hidroxisuccinimida, cloruro ácido e intermedios de urea.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «extremo que reacciona con azido» y/o «grupo funcional que reacciona con azido» hace referencia a cualquier grupo funcional que puede reaccionar con un grupo funcional azida. Algunos ejemplos de grupos funcionales que reaccionan con azida incluyen, pero sin limitarse a ellos, alquinos, alenos y fosfinas.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «extremo que reacciona con alquino» y/o «grupo funcional que reacciona con alquino» hace referencia a cualquier grupo funcional que puede reaccionar con un grupo funcional alquino. Los ejemplos de un grupo funcional que reacciona con alquino incluyen, pero sin limitación, las azidas, que pueden reaccionar en presencia de una fuente de Cu^I , que incluye pero sin limitación, Cu^0 , Cu^I , Cu^{II} y un reactivo reductor, tal como ascorbato de sodio.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «radical alifático» o «grupo alifático» hacen referencia de manera general a una disposición de átomos de carbono que no es cíclica y que tiene un punto de unión que es un átomo de carbono sp^3 . La disposición de átomos de carbono podría además comprender cualquier combinación de átomos de carbono con hibridación sp^3 , sp^2 o sp . Además, la disposición de átomos de carbono podría ser monovalente, divalente o trivalente. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, *tert*-butilo, isooctilo, bencilo, ciclohexilmetilo y fenetilo, 1',1'-dimetilbencilo.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «radical aromático» y/o «grupo aromático» hacen referencia a una disposición cíclica de átomos de carbono con hibridación sp^2 y dobles enlaces conjugados carbono-carbono, y tiene un punto de unión en un átomo de carbono aromático con hibridación sp^2 que forma parte de la disposición cíclica de átomos de carbono. El grupo o radical aromático podría tener de uno al número máximo permisible de sustituyentes. Ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo, fenilo sustituido, toliilo, toliilo sustituido, xililo, mesitilo, clorofenilo, naftilo, furilo, tienilo y pirrolilo.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «radical cicloalquilo» o un «grupo cicloalquilo» hace referencia a una disposición cíclica de átomos de carbono con hibridación sp^3 y tiene un punto de unión en un átomo de carbono con hibridación sp^3 que forma parte de la disposición cíclica de átomos de carbono. La disposición de átomos de carbono podría además comprender cualquier combinación de átomos de carbono con hibridación sp^3 , sp^2 o sp . Además, la disposición cíclica de átomos de carbono podría estar sustituida con de una al número máximo permisible de sustituyentes. Además, la disposición cíclica de átomos podría comprender heteroátomos, tales como O, N o S. Ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen ciclohexilo, metilciclohexilo, trimetilciclohexilo, fenilciclohexilo, tetrahidropiraniilo, 4-tiaciclohexilo y ciclooctilo.

La terminología «un grupo disulfuro capaz de realizar una reacción de intercambio de tiol con un grupo tiol» hace referencia a los grupos que podrían reaccionar con un grupo tiol de una biomolécula. Así pues, un disulfuro se podría considerar como un grupo que reacciona con tiol. El disulfuro de piridilo es un ejemplo de tal disulfuro.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «azida sustituida con flúor» denota un compuesto que contiene azida que tiene al menos un sustituyente de flúor. Además, el flúor sustituyente podría ser de cualquier variedad isotópica, tal como, por ejemplo, ^{18}F y ^{19}F . En una realización, el flúor sustituyente es ^{18}F . La azida podría ser una azida alifática, una azida cicloalifática o una azida aromática. Además, las azidas cicloalifáticas y las azidas aromáticas podrían tener estructuras monocíclicas, bicíclicas o policíclicas.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «alquino sustituido con flúor» denota un compuesto que contiene alquino que tiene al menos un sustituyente de flúor. Además, el flúor sustituyente podría ser de cualquier variedad isotópica, tal como, por ejemplo, ^{18}F y ^{19}F . En una realización, el flúor sustituyente es ^{18}F . El alquino podría ser un alquino alifático, un alquino cicloalifático o un alquino aromático. Además, los alquinos cicloalifáticos y los alquinos aromáticos podrían tener estructuras monocíclicas, bicíclicas o policíclicas.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «proteína», «péptido» y «polipéptido» se utilizan en la presente memoria para describir cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o de la modificación postraduccional, tal como glucosilación o fosforilación. Así pues, los términos se podrían utilizar indistintamente en la presente memoria para hacer referencia a un polímero de restos aminoacídicos. Los términos también se aplican a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos aminoacídicos es un imitador químico artificial del aminoácido correspondiente que se produce de forma natural. Así pues, el término «polipéptido» incluye las proteínas completas que se producen de forma natural, así como los polipéptidos producidos por métodos recombinantes o sintéticos que corresponden a una proteína completa que se produce de forma natural, o a determinados dominios o porciones de una proteína que se producen de forma natural.

La terminología «radical» y «grupo», tal y como se aplica a los términos «alquilo», «alifático», «cicloalifático» y «aromático», se utiliza indistintamente en la presente memoria.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «extremo que reacciona con tiol» y/o «grupo funcional que reacciona con tiol» hace referencia a un grupo funcional que podría reaccionar con un grupo tiol o un grupo

5 mercaptano (a saber, un grupo -SH). Ejemplos de grupos funcionales que reaccionan con tiol incluyen, pero sin limitarse a ellos, un grupo maleimido, un grupo haloalifático, un grupo haloaromático, un grupo halocicloalifático, un grupo (haloacetil)alquilo, un grupo (haloacetil)cicloalquilo, un grupo (haloacetil)arilo, un grupo sulfona con insaturación α , β , un grupo vinilsulfona, un grupo carbonilo con insaturación α , β , un grupo epoxi, un grupo aziridina y un grupo disulfuro capaz de realizar una reacción de intercambio de tiol con un grupo tiol.

Los grupos maleimido idóneos incluyen el grupo (sin sustituir) original así como derivados que comprenden grupos alifáticos, cicloalifáticos o aromáticos como sustituyentes. Los grupos carbonilo con insaturación α , β idóneos incluyen ésteres con insaturación α , β y sulfonas con insaturación α , β . El grupo vinilsulfona es un ejemplo específico de un grupo sulfona con insaturación α , β .

10 A menos que se indique de otra manera, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como masa molecular, condiciones de reacción, etcétera, utilizadas en lo sucesivo en la especificación y en las reivindicaciones se entenderá que están modificados en todos los ejemplos con el término «aproximadamente». Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos presentados en la siguiente especificación y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que podrían variar según las propiedades
15 deseadas que se persigue obtener mediante la presente invención. Al menos, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe al menos considerarse a la luz del número de dígitos significativos descritos y por aplicación de las técnicas de redondeo habituales.

20 Hay aspectos de la invención que hacen referencia a un método para introducir un átomo de flúor en una biomolécula. El método incluye las etapas de

(i) dotar de un conector que incluye un extremo que reacciona con tiol y un extremo que reacciona con alquino o azido;

(ii) hacer reaccionar el extremo que reacciona con tiol del conector con la biomolécula que incluye al menos un grupo tiol o un derivado reactivo del mismo; y

25 (iii) posteriormente, hacer reaccionar el extremo que reacciona con el azido o el alquino del conector con un grupo azida o alquino sustituido con flúor, respectivamente.

Otro aspecto de la invención es dar a conocer una composición de bioconjugado que comprende unidades estructurales derivadas de una biomolécula que comprende al menos un grupo tiol y un conector. El conector se podría preparar mediante un método que comprende hacer reaccionar un compuesto amina que comprende un
30 grupo funcional que reacciona con alquino o azido con un ácido carboxílico o un éster activado que comprende un grupo funcional que reacciona con tiol. En otro aspecto, el conector se podría preparar al hacer reaccionar un compuesto amina que comprende un grupo funcional que reacciona con tiol con ácido carboxílico o un compuesto de éster activado que comprende un grupo funcional que reacciona con alquino o azido.

Biomoléculas

35 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «biomoléculas» hace referencia a moléculas que se producen de forma natural o artificiales que comprenden al menos un grupo tiol (también algunas veces se denomina grupo «mercapto») o un derivado reactivo del mismo para la reacción con el conector. El grupo tiol podría aparecer de forma natural en la biomolécula o bien se podría introducir químicamente o manipular con los métodos biológicos estándares o con los métodos reconocidos en la técnica como idóneos. En algunas realizaciones, se
40 excluyen específicamente las biomoléculas que tienen menos de 50 restos aminoácidos.

Tales biomoléculas podrían tener uno o bien varios grupos SH en su estado natural, o se podrían manipular genéticamente, por ejemplo, con técnicas de biología molecular estándares. Ejemplos de biomoléculas que tienen un grupo SH de forma natural incluyen las conectadas a uno o varios aminoácidos de cisteína. Mediante la terminología «derivado reactivo del mismo» se hace referencia a un derivado del grupo SH que está activado para
45 generar el grupo tiol libre para la reacción con el compuesto conector.

Ejemplos de biomoléculas que comprenden uno o varios grupos tiol de forma natural o grupos tiol manipulados químicamente incluyen péptidos, polipéptidos, vector, lípidos, polisacáridos, glucosaminoglucanos y versiones modificadas de los mismos, glucolípidos, glucoproteínas, polímeros sintéticos, modificadores de la respuesta celular (por ejemplo, factores de crecimiento, factores quimiotácticos o citocinas), enzimas, receptores, neurotransmisores,
50 hormonas, citocina, vacunas, haptenos, toxinas, interferones y ribozimas. Los métodos descritos también se podrían aplicar a moléculas que no contienen un grupo tiol, pero que están conjugadas a una molécula que sí contiene un grupo tiol. Más ejemplos de biomoléculas incluyen proteínas, fragmentos de proteínas, variantes de proteínas, andamiajes proteicos, proteínas, nucleótidos y moléculas relacionadas manipuladas genéticamente, ácidos nucleicos, conjugados de oligo-ADN u oligo-ARN a péptido, anticuerpos tales como anticuerpos policlonales y monoclonales, y fragmentos de anticuerpos. Así pues, los métodos descritos se podrían utilizar para fluorar ácidos
55 nucleicos que incluyen ácidos desoxirribonucleicos (p. ej., oligodesoxinucleótidos, sondas de ácido nucleico,

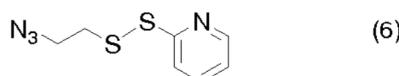
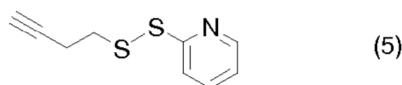
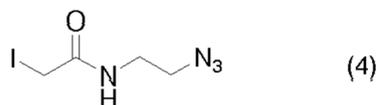
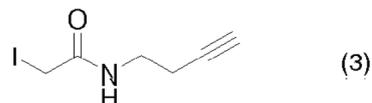
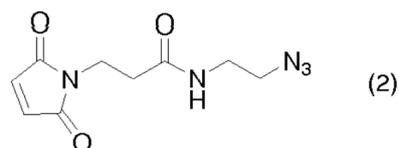
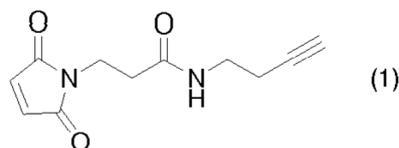
plásmidos), ácidos ribonucleicos (p. ej., siRNA) asociados a una molécula que contiene tiol, tal como un polipéptido que tiene un grupo tiol.

Las biomoléculas podrían ser cualquiera de las biomoléculas que aparecen en la naturaleza o que se manipulan artificialmente para que tengan al menos un grupo tiol. En todas las realizaciones, la biomolécula podría incluir restos de aminoácidos que aparecen en la naturaleza y/o artificiales. En otra realización, la biomolécula que comprende al menos un grupo tiol comprende un resto de cisteína o un grupo artificial. Con la terminología «resto de cisteína» se quiere hacer referencia al fragmento estructural que no es el grupo tiol que se obtiene una vez que la cisteína queda incluida como una parte de la cadena de la biomolécula. Aún en otra realización, la biomolécula para la reacción con el conector es una que tiene un resto de cisteína manipulado, lo que significa que una biomolécula precursora idónea se podría modificar químicamente para generar la biomolécula deseada que tiene el grupo tiol y el resto de cisteína.

En algunos casos, una biomolécula se podría tratar con un reductor para generar un grupo tiol reactivo. Por ejemplo, una biomolécula que tiene un enlace disulfuro se podría reducir con un reductor idóneo para producir dos equivalentes de una biomolécula que tiene un grupo tiol. Los ejemplos de reductores útiles incluyen el 2-mercaptoetanol, la 2-mercaptoetanolamina, el ditiotreitól (DTT) y la tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP).

Conectores:

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «conector» hace referencia a un compuesto bifuncional que comprende un extremo que reacciona con tiol, o un derivado protegido del mismo, y un extremo que reacciona con alquino o azido, o un derivado protegido del mismo. Los conectores se podrían utilizar para unir un compuesto que contiene tiol en una punta a través del extremo que reacciona con tiol, y para la unión a azida o alquino, sobre todo en azida o alquino sustituido con flúor en la otra punta a través del extremo que reacciona con alquino o azido, respectivamente. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «conector bifuncional mal-alquino» hace referencia a un conector que tiene un grupo maleimido en un primer extremo y un grupo alquino en un segundo extremo, tal como el conector *N*-(but-3-inil)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)propanamida (1), y «conector bifuncional mal-azida» hace referencia a un conector que tiene un grupo maleimido en un primer extremo y un grupo azida en un segundo extremo, tal como el compuesto (2). Los conectores de la invención se muestran en las estructuras (1) a (6).



Los conectores se podrían utilizar para unir un compuesto que contiene tiol en una punta a través del extremo que reacciona con tiol, y/o unir la azida o el alquino (p. ej., azida o alquino sustituido con flúor) en la otra punta a través del extremo que reacciona con alquino o azido, respectivamente.

Preparación del conector

5 El conector se podría preparar mediante cualquier método que hace que tanto el grupo funcional que reacciona con tiol como el grupo funcional que reacciona con alquino o azido estén accesibles para la reacción con (i) la biomolécula que tiene al menos un grupo tiol, y (ii) la azida o el alquino sustituido con flúor, respectivamente. En una realización, el conector se prepara al hacer reaccionar un compuesto amina que comprende un grupo funcional que reacciona con alquino o azido con un ácido carboxílico o un éster activado que comprende un grupo funcional que reacciona con tiol. Se podría utilizar cualquier compuesto amina que tiene un grupo funcional que reacciona con alquino o azido. En una realización, el compuesto amina comprende una estructura (7),



10 en donde G es un grupo funcional que reacciona con alquino o azido, J es una unidad conectora y R¹ es H, un radical alifático, un radical aromático o un radical cicloalifático. La naturaleza de la unidad conectora divalente J está diseñada para disminuir al mínimo el impedimento estérico, lo que podría afectar de manera adversa la reactividad de los grupos funcionales reactivos con tiol y reactivos con alquino o azido.

15 En otras realizaciones, el conector se podría preparar al hacer reaccionar un compuesto amina que comprende un grupo funcional que reacciona con tiol con un ácido carboxílico o un compuesto de éster activado que comprende un grupo funcional que reacciona con alquino o azido. El ácido carboxílico o el éster activado comprende una estructura (8),



20 en donde L comprende un grupo funcional que reacciona con tiol o un derivado protegido del mismo; M es una unidad conectora divalente, y R² es OH o un grupo activador. El grupo activador R² facilita la reacción del compuesto amina que tiene el grupo funcional que reacciona con alquino o azido con el átomo de carbono carbonílico de estructura (8).

Los conectores de la invención que tienen las estructuras (1) a (6) tienen la siguiente fórmula común:



25 en donde L es un grupo funcional que reacciona con tiol;

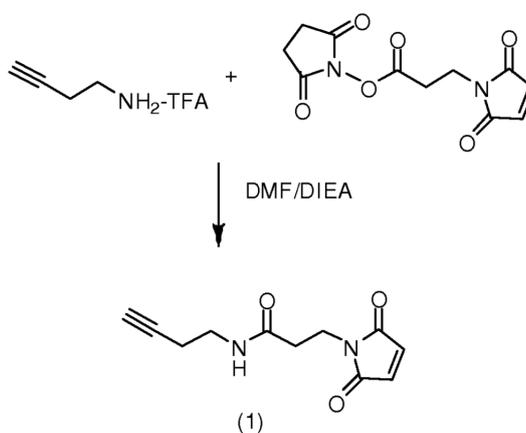
M y J son las unidades bifuncionales/unidades conectoras;

R¹ es H, un radical alifático, un radical aromático o un radical cicloalifático; y

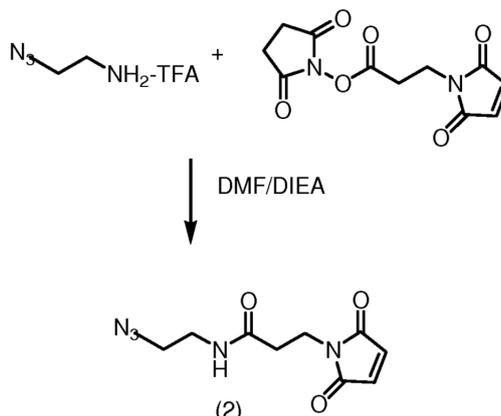
G es un grupo funcional que reacciona con alquino o azido.

30 Las estrategias sintéticas de ejemplo para preparar el conector que tiene la estructura (1) y (2) son tal y como se muestran en los esquemas de reacción 1 y 2.

Esquema de reacción 1



Esquema de reacción 2



En los esquemas de reacción 1 y 2, DMF representa dimetilformamida y DIEA representa la diisopropiltilamina. Algunos ejemplos de conectores que se podrían preparar con estos métodos se muestran más arriba en las estructuras (1) a (6).

5 Bioconjugados

Los productos de resultas de la reacción del conector con la biomolécula que tiene al menos un grupo tiol se denominan bioconjugados. Así pues, en una realización, el bioconjugado comprende unidades estructurales derivadas de: (i) una biomolécula que comprende al menos un grupo tiol; y (ii) un conector; donde el conector se prepara mediante un método que comprende hacer reaccionar un compuesto amina que comprende un grupo funcional que reacciona con alquino o azido con un ácido carboxílico o un éster activado que comprende un grupo funcional que reacciona con tiol. En otra realización, el bioconjugado comprende unidades estructurales derivadas de: (i) una biomolécula que comprende al menos un grupo tiol; y (ii) un conector; en donde el conector se prepara mediante un método que comprende hacer reaccionar un compuesto amina que comprende un grupo funcional que reacciona con tiol con un ácido carboxílico o un éster activado que comprende un grupo funcional que reacciona con alquino o azido. En otro aspecto, el conector se podría preparar al hacer reaccionar un compuesto amina que comprende un grupo funcional que reacciona con tiol con un ácido carboxílico o un compuesto de éster activado que comprende un grupo funcional que reacciona con alquino o azido.

Métodos para la fluoración de bioconjugados

Los métodos descritos en la presente memoria permiten la preparación de bioconjugados marcados con flúor, más en concreto, bioconjugados marcados con radioflúor (p. ej., ^{18}F). Una de las ventajas de estos métodos es que el conector se podría unir selectivamente a una biomolécula, tal como una biomolécula en condiciones no radioactivas, en las que el grupo tiol de la biomolécula se podría hacer reaccionar selectivamente con el grupo funcional que reacciona con tiol del conector, y el bioconjugado resultante se podría purificar antes de la reacción con una azida o un alquino sustituido con flúor normal o ^{18}F . Otra ventaja es que la marca con radioflúor se podría añadir selectivamente en una etapa final, lo que elimina la necesidad de más etapas de purificación que llevan su tiempo antes de preparar el bioconjugado final, en especial en cantidades para rastreo.

Los métodos descritos en la presente memoria para introducir flúor en un bioconjugado se podrían utilizar para generar el bioconjugado fluorado de cualquier longitud. Así pues, en algunas realizaciones, la biomolécula del bioconjugado comprende al menos 50 restos aminoacídicos o al menos 100 restos aminoacídicos.

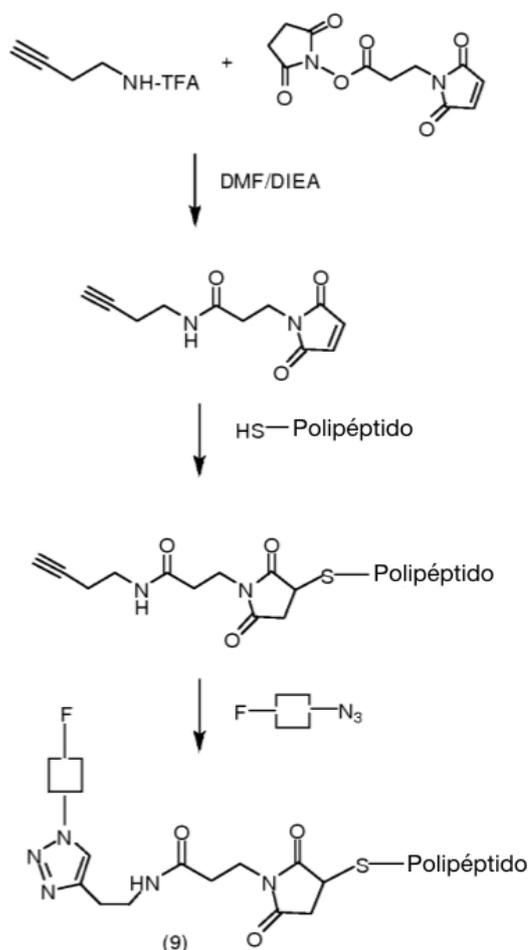
En un aspecto, se describen los métodos para introducir uno o varios átomos de flúor en una biomolécula. Los métodos podrían comprender: (i) dotar de un conector que comprende un extremo que reacciona con tiol y un extremo que reacciona con alquino o azido; (ii) hacer reaccionar el extremo que reacciona con tiol del conector con una biomolécula que comprende al menos un grupo tiol o un derivado reactivo del mismo; y (iii) posteriormente, hacer reaccionar el extremo que reacciona con alquino o azido del conector con una azida o un alquino sustituido con flúor, respectivamente.

Más en concreto, los métodos descritos en la presente memoria se podrían emplear para introducir uno o varios átomos de flúor en una biomolécula mediante el uso de un conector bifuncional mal-alquino, tal como *N*-(but-3-inil)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)propanamida (1) como conector. Tales métodos comprenden: (i) hacer reaccionar el grupo que reacciona con tiol de la *N*-(but-3-inil)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)propanamida (1) con una biomolécula que comprende al menos un grupo tiol; y (ii) posteriormente, hacer reaccionar el grupo alquino del producto intermedio resultante de la etapa (i) con una azida sustituida con flúor. En otra realización, los métodos se podrían emplear para introducir uno o varios átomos de flúor en una biomolécula mediante el uso de un conector bifuncional mal-azida, tal como el compuesto (2), a modo de conector. Tales métodos comprenden: (i) hacer

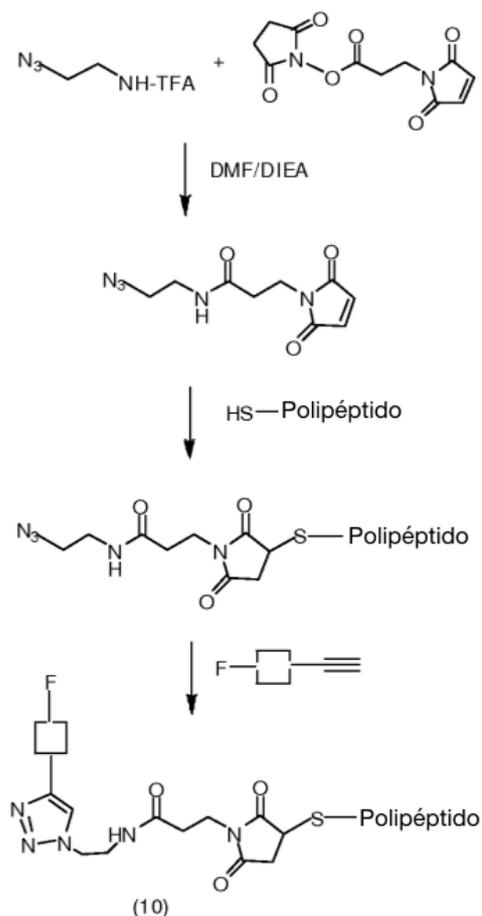
reaccionar el grupo funcional que reacciona con tiol del compuesto (2) con una biomolécula que comprende al menos un grupo tiol; y (ii) posteriormente, hacer reaccionar el grupo azida del producto intermedio resultante de la etapa (i) con un alquino sustituido con flúor.

5 La reacción del extremo que reacciona con alquino o azido del conector con la azida o el alquino sustituido con flúor se podría llevar a cabo en cualquier medio que podría oscilar de condiciones ligeramente ácidas a ligeramente básicas. En una realización, la reacción se podría efectuar en un medio que tenga un pH en un margen de aproximadamente 6 a aproximadamente 9; y en otra realización, en un margen de pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 8. La temperatura de la reacción podría hacerse variar desde la temperatura ambiente a aproximadamente 70 °C. El tiempo de reacción podría variar, pero por lo general podría ser de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 60 minutos. En algunas realizaciones, el tiempo de reacción varía de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos. No obstante, también se podrían emplear tiempos de reacción más largos. La reacción se podría llevar a cabo en presencia de Cu^I , o un precursor del mismo, que incluye, pero sin limitación, sales de Cu^0 , Cu^I o Cu^{II} , en presencia de un reactivo reductor, tal como, pero sin limitarse a él, ascorbato de sodio. Los esquemas de reacción 3 y 4 muestran las posibles estrategias para preparar bioconjugados marcados con flúor (9) y (10).

Esquema de reacción 3



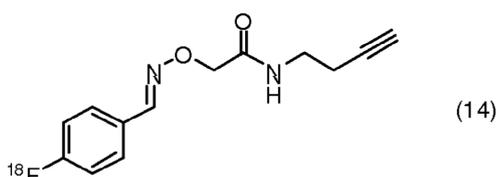
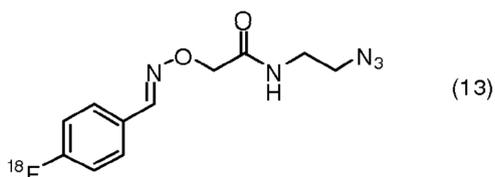
Esquema de reacción 4



20 En una estrategia, el precursor de un conector que contiene alquino o azida se podría hacer reaccionar primero con un polipéptido que comprende un grupo tiol, y el intermedio resultante se transforma para dar el bioconjugado deseado. Otra posibilidad es que el precursor de un conector que contiene alquino o azida se podría transformar primero para dar el conector, que a continuación se podría hacer reaccionar con el polipéptido que comprende el grupo tiol para dar el producto.

Mediante el uso de las técnicas descritas más arriba, se podrían introducir uno o varios átomos de flúor o radioflúor, tal como ^{18}F , en una biomolécula. Cuando una azida o un alquino sustituido con flúor se hace reaccionar con un bioconjugado, se obtiene un bioconjugado sustituido con flúor. Cuando una azida o un alquino sustituido con

radioflúor se hace reaccionar con un bioconjugado, se obtiene un bioconjugado marcado con radioflúor. En las estructuras (11) a (14) se muestran ejemplos de azida/alquino sustituidos con flúor idóneos.



5 Cualquiera de las biomoléculas, tales como polipéptidos, descritas previamente que tienen al menos un grupo tiol se podrían utilizar para preparar los bioconjugados. Biomoléculas tales como polipéptido, vectores, andamiajes proteicos y proteínas de fijación manipuladas genéticamente que tienen al menos un grupo tiol son especialmente valiosos, ya que tales materiales tienen un valor diagnóstico y terapéutico potencialmente valioso. Así pues, en una realización, los bioconjugados se podrían producir al hacer reaccionar los andamiajes proteicos, tales como

10 aficuerpos, con un conector bifuncional mal-alquino, tal como el conector *N*-(but-3-inil)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)propanamida (1). En otra realización, se podrían producir bioconjugados al hacer reaccionar los andamiajes proteicos, tales como los aficuerpos, con un conector bifuncional mal-azida, tal como el compuesto (2). Además, los bioconjugados marcados con flúor se podrían producir al hacer reaccionar el bioconjugado con una azida o un alquino sustituido con flúor.

15 Los bioconjugados marcados con flúor son materiales valiosos en las aplicaciones diagnósticas. Los bioconjugados marcados con ^{18}F se podrían visualizar mediante técnicas de imagen conocidas en el área de conocimiento, tales como, por ejemplo, técnicas de PET (tomografía por emisión de positrones).

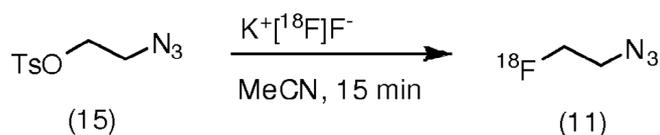
Ejemplos

La puesta en práctica de la invención se conocerá más a fondo a partir de los ejemplos que vienen a continuación.

20 Las abreviaturas utilizadas en el apartado de ejemplos se expanden del siguiente modo: «mg»: miligramos; «ml»: mililitros; «mg/ml»: miligramos por mililitro; «mmol»: milimoles; «μl»: microlitro; «kDa»: kilodalton; «MALDI-MS»: espectrometría de masa tras la desorción e ionización por láser asistida por una matriz; «HPLC»: cromatografía líquida de alta resolución; «LC-MS»: espectrometría de masas tras la cromatografía líquida; «ESI-MS»: espectrometría de masas tras la ionización por electropulverización; «MALDI-TOF MS»: espectrometría de masas tras la desorción e ionización por láser asistida por una matriz-tiempo de vuelo; «TFA»: ácido trifluoroacético;

25 «DMSO»: dimetilsulfóxido; «DTT»: ditioneitol; «MeCN»: acetonitrilo; «PBS»: solución salina tamponada con fosfato; «Mal»: maleimido; «ppm»: partes por millón; «MWCO»: umbral de masa molecular; «condición fría»: sin isótopo radiactivo y «rendimiento radioquímico»: fracción de la actividad originalmente presente. A menos que se indique de otra manera, todas las sustancias químicas de calidad para reactivo se utilizaron tal y como se recibieron, y se utilizó agua Millipore en la preparación de todas las soluciones acuosas.

30 Ejemplo 1: Preparación de la 2-[^{18}F]fluoroetilazida (11)



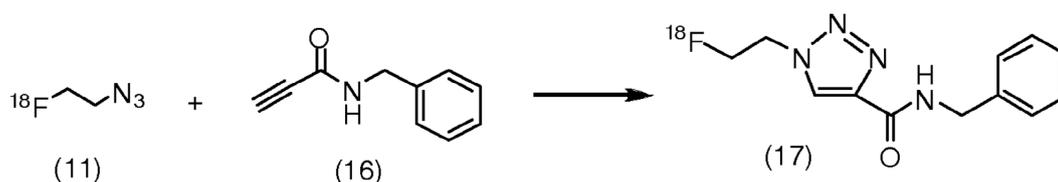
Esquema de reacción 5

Se produjo el [^{18}F]fluoruro mediante un ciclotrón con la reacción nuclear de $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ con irradiación de protones de 19 MeV de una diana enriquecida en [^{18}O]H₂O. Después de la irradiación, se le añadió una mezcla de Kryptofix®

(5 mg, 13,3 μmol), carbonato de potasio (1 mg, 7,2 μmol) y MeCN (1 ml) a ^{18}F -agua (1 ml). El disolvente se retiró por calentamiento a 80 °C en una corriente de nitrógeno (100 ml/min). Después, se le añadió MeCN (0,5 ml) y se evaporó con calentamiento y corriente de nitrógeno. Este procedimiento se repitió dos veces. Después de enfriarla a temperatura ambiente, se le añadió una solución de ácido toluenosulfónico-2-azidoetiléster (15) en MeCN anhidro (0,2 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 15 min a 80 °C. Después de añadirle el MeCN (0,3 ml), se destiló la 2- ^{18}F fluoroetilazida (11) a 130 °C con flujo de nitrógeno (15 ml/min) en un vial de atrapamiento con MeCN (0,1 ml). Este compuesto (11) se recogió con un rendimiento radioquímico corregido para la desintegración del 54% (ref. a ^{18}F -fluoruro) y una eficacia de destilación del 63%.

En la figura 2 se muestran los resultados del análisis por HPLC de una mezcla de reacción que contiene 2- ^{18}F fluoroetilazida (11) con el gradiente I, UV a 216 nm (a, canal de radiactividad, 2- ^{18}F fluoroetilazida (11) a 3:51 min; b, canal de UV) y el producto 2- ^{18}F fluoroetilazida (11) destilado (c, canal de radiactividad; d, canal de UV).

Ejemplo 2: Estudios de la concentración que muestran la formación del triazol a diferentes concentraciones del sustrato pequeño



Esquema de reacción 6

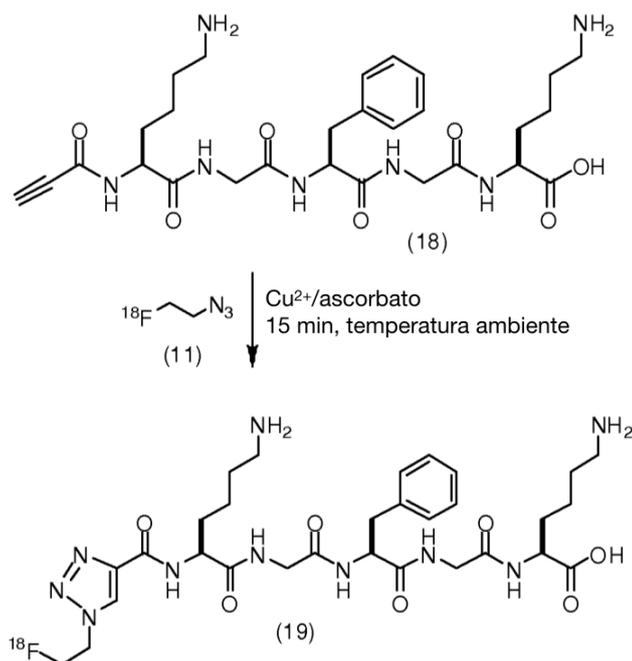
En el estudio de la concentración, el modelo de alquino (16) (1,2-0,01 mg, 7,5-0,25 μmol) se disolvió en DMF (50 μl) y se mezcló en nitrógeno con una solución acuosa de sulfato de cobre(II) (25 μl , 2,8 mg, 11,25 μmol) y ascorbato de sodio (25 μl , 7,5 mg, 37,5 μmol). Después de añadir la ^{18}F 2-fluoroetilazida (11) en MeCN (100 μl) y de dejarla reposar durante 15 min a temperatura ambiente, la mezcla se analizó por HPLC. Los viales se calentaron (15 min, 80 °C) posteriormente y se analizaron de nuevo.

El producto triazólico resultante (17) se obtuvo en un rendimiento cuantitativo a temperatura ambiente con una concentración mínima del modelo de alquino (16) de 3,14 mM (100 μg). Cuando la mezcla de reacción se calentó a 80 °C, la concentración mínima del modelo de alquino (16) fue de 1,57 mM (50 μg) para un rendimiento cuantitativo del triazol (17) resultante.

En la figura 3 se muestra el gráfico de HPLC del rendimiento radioquímico del producto triazólico (17) formado a concentraciones y temperaturas diferentes de alquino (16) con el compuesto modelo (16) y la 2- ^{18}F fluoroetilazida (11).

Ejemplo 3: Formación de triazol en el péptido

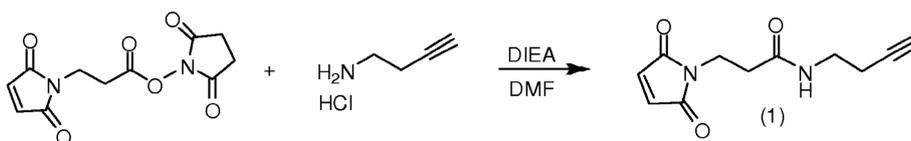
Preparación del ácido ^{18}F [(S)-6-amino-2-(2-((S)-2-[2-((S)-6-amino-2-{[4-(2-fluoroetil)-[1,2,3]triazol-1-carbonil]-amino)-hexanoilamino]-acetilamino]-3-fenilpropionilamino)-acetilamino)-hexanoico (19).



Esquema de reacción 7

A una solución de sulfato de cobre(II) pentahidrato (4,3 mg, 17 μ mol) en agua (50 μ l), se le añadió ascorbato de sodio (3,4 mg, 17 μ mol) en agua (50 μ l) en atmósfera de nitrógeno. Después de aproximadamente un minuto a temperatura ambiente, se le añadió una solución del precursor del péptido alquino (18) (2 mg, 3,4 μ mol, en el tampón de fosfato de sodio, pH 6,0, 0,5 M, 50 μ l), seguido de una solución de 2-[¹⁸F]fluoroetilazida (11) (24-32 MBq) en MeCN (50 μ l). La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos y se diluyó con la fase móvil A de la HPLC (agua, TFA al 0,1%) (0,3 ml). El péptido marcado (19) se aisló por HPLC semipreparativa (UV a 216 nm, Rt = 6:24).

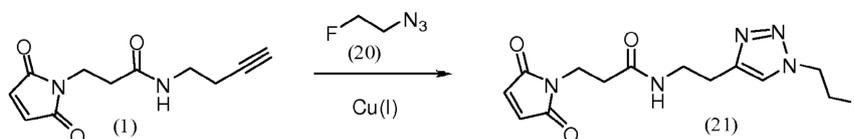
10 Ejemplo 4: Síntesis del conector bifuncional mal-alquino (1)



Esquema de reacción 8

El éster *N*-[β -maleimidopropiloxi]succinimida (50 mg, 1,25 equiv.) se disolvió en 1,0 ml de DMF seca. El hidrocloreto de 3-butín-1-amina (16 mg, 1,0 equiv.) se disolvió en 0,5 ml de dimetilformamida (DMF) seca y 26 μ l de diisopropiletilamina (DIEA). Esta solución de amina se añadió gota a gota al éster de succinimida mientras que se mantenía la solución del éster en un baño de hielo. La mezcla se agitó a 0 $^{\circ}$ C durante 10 min. La solución se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 18 h. Los solventes se evaporaron al vacío y el residuo se disolvió en 5 ml de CH₂Cl₂. La solución orgánica se extrajo con salmuera (3 \times 5 ml) y se secó sobre MgSO₄. El solvente se retiró a presión reducida y el material bruto se purificó por cromatografía rápida (sílice, MeOH/CH₂Cl₂). El producto (1) se purificó desde grasa al disolver la muestra en una cantidad mínima de CH₂Cl₂ (unos 2 ml), seguido de tres lavados con hexano. El producto (1) precipitó como un sólido blanco algodonoso. La caracterización del producto se consiguió por ¹H-RMN. Rendimiento; 8,2 mg (25%). ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 2,02 (s, 1), 2,41 (t, J = 5 Hz, 2), 2,57 (t, J = 5 Hz, 2), 3,42 (td, J = 5 Hz, 2), 3,88 (t, J = 5 Hz), 5,90 (bs, 1), 6,73 (s, 2).

Ejemplo 5: Preparación de la 2-fluoroetiltriazol-maleimida (compuesto de referencia) (21)



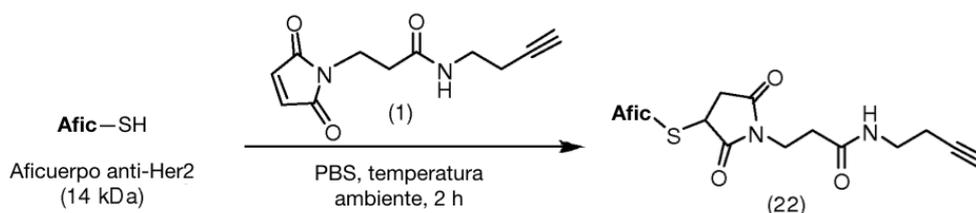
25

Esquema de reacción 9

Una mezcla del tampón de fosfato de sodio (20 μ l, 250 mM, pH 6,0), DMF (50 μ l) y polvo de cobre (100 mg, malla de -40, n.º de cat. 26,608-6 de Aldrich) se purgó con nitrógeno gaseoso (10 ml/min) durante 5 min. El contenedor se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora después de la adición de la 2-fluoroetilazida (20) (10 μ mol) en DMF (9,2 μ l, preparado como está descrito por Glaser y Årstad 2007) y la 3-(*N*-maleimidil)-*N*-(3-propargil)propionamida (1) (2,1 mg, 9,5 μ mol) en DMF (20 μ l). El solvente se retiró a presión reducida (1 mbar, 80 °C). La purificación por HPLC preparativa dio el compuesto fluoroetiltriazol (21) (1,2 mg, 41%). HR ESI-MS: para $C_{13}H_{16}N_5O_3F$ (calculado: $m/z = 310,1310$; encontrado: $m/z = 310,1314$).

Purificación por HPLC preparativa (gradiente: solvente B del 5 al 80% durante 15 min, donde A = H_2O/TFA al 0,1% y B = $MeCN/TFA$ al 0,1%, velocidad de flujo: 15 ml/min; columna: Luna 5 μ m C18(2) (Phenomenex), 75 \times 30 mm, detección: UV 216 nm).

Ejemplo 6: Alquinilación del anticuerpo y reacción con el conector bifuncional mal-alquino



Esquema de reacción 10

El anticuerpo anti-Her2, 14 kDa (1 mg como un polvo liofilizado) se disolvió en 460 μ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS). El pH de la solución se mantuvo a 7,4. A esta solución se le añadieron 40 μ l de una solución a 0,5 M de ditioneitol (DTT) disuelto en PBS; el pH se mantuvo a 7,4. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El anticuerpo reducido se purificó por filtración en gel. A esta fracción pura del anticuerpo reducido se le añadió una alícuota de 12 μ l de una solución del conector bifuncional mal-alquino (1) (0,15 M en DMSO). Esta mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 2 h con agitación moderada. La mezcla de reacción se purificó por filtración en gel seguida de ultrafiltración por centrifugación (Amicon), MWCO de 5 kDa (Millipore), para obtener el anticuerpo alquinilado purificado (22).

La caracterización del anticuerpo alquinilado purificado (22) resultante se consiguió por (MALDI-TOF-MS) y HPLC seguido de LC(ESI)-MS. Rendimiento (%): 78; MS: (MH^+ calculada: 14260, encontrada: 14260). En la figura 4 se muestran los datos de la MALDI-TOF MS del anticuerpo alquinilado (22).

Condiciones estándares para el análisis por HPLC del anticuerpo alquinilado (22): se utilizó la columna C4 para proteínas Grace Vydac para el análisis por HPLC. Solvente A: H_2O al 100%, TFA al 0,1%. Solvente B: $MeCN$ al 100%, TFA al 0,1%; detección: UV 216 y 280 nm; velocidad de flujo: 1 ml/min. La concentración de solvente cambió con el tiempo tal y como se muestra en la tabla 1 que viene a continuación.

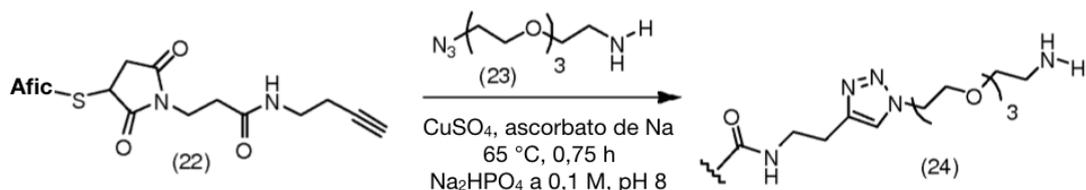
30

Tabla 1

| Tiempo | % A | % B |
|--------|-----|-----|
| 0 | 100 | 0 |
| 4 | 80 | 20 |
| 16 | 40 | 60 |
| 20 | 0 | 100 |

El tiempo de elución típico para el anticuerpo alquinilado (22) fue de aproximadamente 11 minutos.

Ejemplo 7: Formación del triazol en el bioconjugado en condiciones frías

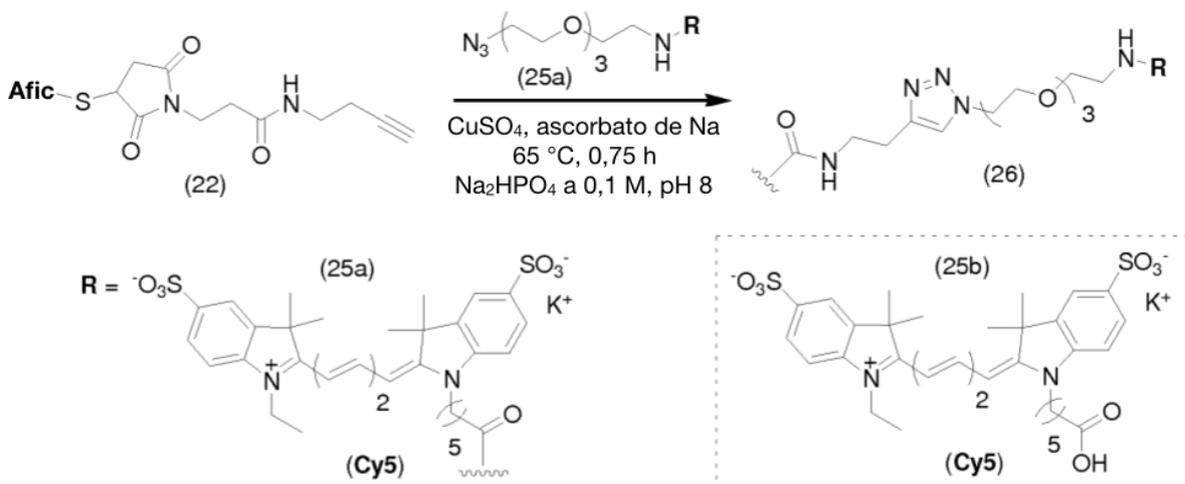


Esquema de reacción 11

5 Marcación del aficuerpo alquinilado (22) mediante el uso de azido-PEG (23). A 36 μl de una solución acuosa de fosfato de sodio (100 mM, pH 8) se le añadió una alícuota de 3 μl de una solución concentrada de aficuerpo alquinilado (22) (0,6 mM, ~ 8 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato, a pH 7,4). A esta solución se le añadió una alícuota de 1 μl de una solución a 18 mM recién preparada de 11-azido-3,6,9-trioxaundecán-1-amina (azido-PEG) (23) (diluída en fosfato de sodio a 100 mM, a pH 8). A continuación, a esta solución se le añadió una alícuota de 5 μl de una solución a 10 mM (2 mg/ml) recién preparada de ascorbato de sodio (en fosfato de sodio a 100 mM, pH 8). Finalmente, se añadió a la mezcla de reacción una alícuota de 5 μl de una suspensión a 10 mM (1,6 mg/ml) recién preparada de sulfato de cobre(II) (en fosfato de sodio a 100 mM, pH 8). Así pues, estas adiciones produjeron las siguientes concentraciones finales para los reactivos y para el sustrato: el aficuerpo alquinilado (22) (36 μM), el azido-PEG (23) (360 μM), el ascorbato de sodio (1 mM) y el CuSO_4 (1 mM).

15 La solución resultante se mezcló a 65°C con agitación moderada durante 0,75 h. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó inmediatamente a 4 ml en agua pura (MilliQ) y se concentró a <100 μl con una unidad de ultrafiltración por centrifugación Amicon, MWCO de 5 kDa (Millipore). Esta secuencia de dilución y concentración se repitió dos veces más para retirar el excedente de los reactivos. La caracterización del conjugado purificado (24) resultante se consiguió con MALDI-TOF-MS y cromatografía líquida de alta resolución seguida de LC(ESI)-MS. Rendimiento (%): 42. MS: (MH^+ calculada: 14478, encontrada: 14492).

Ejemplo 8: Marcación del aficuerpo alquinilado (22) con azido-PEG marcado con Cy5 (25a)



20

Esquema de reacción 12

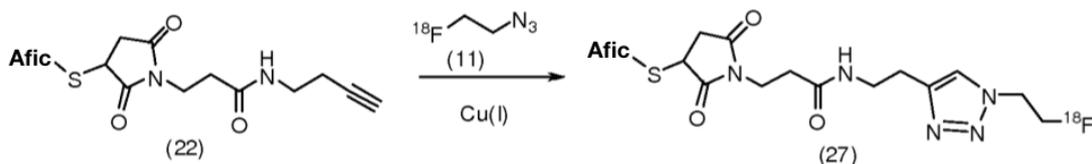
25 A 36 μl de una solución acuosa de fosfato de sodio (100 mM, pH 8) se le añadió una alícuota de 3 μl de la solución concentrada del aficuerpo alquinilado (22) (0,6 mM, ~ 8 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4). Luego se le añadió una alícuota de 1 μl de una solución a 18 mM recién preparada de azido-PEG marcado con Cy5 (25a) (diluído en fosfato de sodio a 100 mM, pH 8). A esta solución, se le añadió entonces una alícuota de 5 μl de una solución a 10 mM (2 mg/ml) recién preparada de ascorbato de sodio (en fosfato de sodio a 100 mM, pH 8). Finalmente, se añadió a la mezcla de reacción una alícuota de 5 μl de una suspensión a 10 mM (1,6 mg/ml) recién preparada de sulfato de cobre(II) (en fosfato de sodio a 100 mM, pH 8). Estas adiciones produjeron las siguientes concentraciones finales para los reactivos y el sustrato: aficuerpo alquinilado (22) (36 μM), azido-PEG marcado con Cy5 (25a) (360 μM), ascorbato de sodio (1 mM) y CuSO_4 (1 mM).

30

35 La solución resultante se mezcló a 65°C con agitación moderada durante 0,75 horas. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó inmediatamente a 4 ml en agua pura (MilliQ) y se concentró a <100 μl con una unidad de ultrafiltración por centrifugación Amicon, MWCO de 5 kDa (Millipore). Esta secuencia de dilución en agua y concentración se repitió dos veces más para retirar el excedente de los reactivos. La caracterización del conjugado purificado resultante (26) se consiguió por HPLC y gel de proteínas en SDS-PAGE con seguimiento de la emisión de

la fluorescencia del colorante (figura 5).

Ejemplo 9: Formación del triazol en el aficuerpo alquinilado (22) en condiciones calientes



Esquema de reacción 13

- 5 Marcación del aficuerpo anti-Her2 (22) con ¹⁸F. Una solución acuosa de sulfato de cobre(II) (5 μ l, 0,0249 mg, 0,1 μ mol) se mezcló con ascorbato de sodio (0,198 mg, 1 μ mol) en tampón de fosfato de sodio (5 μ l, 100 mM, pH 8,0) y el aficuerpo alquinilado (22) (50 μ g, 3,57 nmol) en PBS (5 μ l). Después de la adición de la 2-[¹⁸F]fluoroetilazida (11) (264 μ Ci, 9,8 Mbq, preparada como está descrito por Glaser, M. y Årstad, E. (2007) «Click labeling' with 2-[¹⁸F]fluoroethylazide for Positron Emission Tomography» *Bioconj. Chem.* 18, 989-993, que se incorpora en la
- 10 presente memoria por referencia) en MeCN (20 μ l), la mezcla se calentó a 60 °C durante 30 min. El análisis por HPLC de la marcación con 2-[¹⁸F]fluoroetilazida (11) de la mezcla de reacción mostró una coelución del pico de radiactividad con la señal UV del aficuerpo (27).

- Purificación por HPLC preparativa (gradiente: disolvente B del 5% al 80% durante 15 min, donde A = H₂O/TFA al 0,1% y B = MeCN/TFA al 0,1%, velocidad de flujo: 1 ml/min; columna: Luna 3 μ m C18 (2) (Phenomenex), 50 \times 4,6 mm, detección: UV 280 nm. En la figura 1 se muestra el análisis por HPLC de una mezcla de reacción del sistema
- 15 sin optimizar que muestra el aficuerpo anti-Her2 (27) marcado con ¹⁸F-clic (a, canal de radiactividad; b, canal de UV a 280 nm).

REIVINDICACIONES

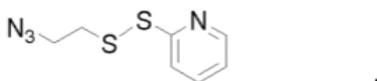
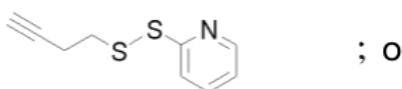
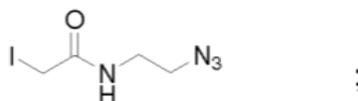
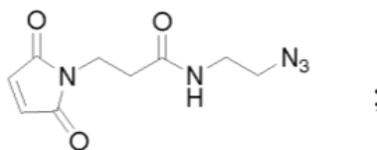
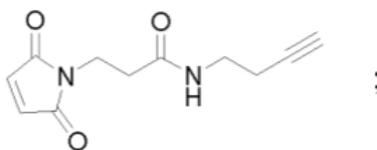
1. Un método para introducir un átomo de flúor en una biomolécula, que comprende:

5 (i) dotar de un conector que incluye un extremo que reacciona con tiol y un extremo que reacciona con alquino o azido;

(ii) hacer reaccionar el extremo que reacciona con tiol del conector con la biomolécula que incluye al menos un grupo tiol o un derivado del grupo tiol que puede ser activado para generar el grupo tiol libre; y

(iii) posteriormente, hacer reaccionar el extremo que reacciona con alquino o azido del conector con un grupo alquino o azida sustituido con flúor;

10 en donde el conector es:



2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la biomolécula tiene más de 50 restos aminoácidos.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la biomolécula es un anticuerpo.

15 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el al menos un grupo tiol incluye un resto de cisteína o un aminoácido artificial que contiene tiol.

5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el derivado reactivo de la biomolécula se produce por tratamiento de la biomolécula con un reductor.

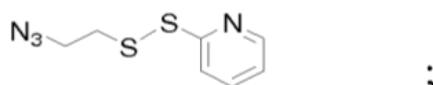
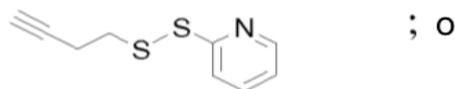
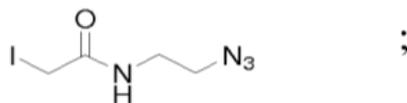
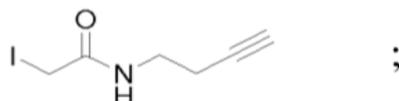
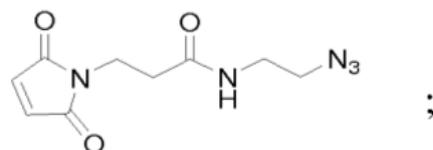
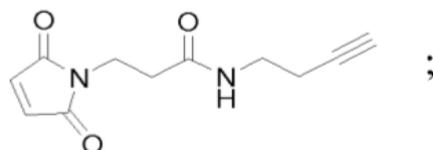
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el alquino o la azida sustituido con flúor comprende alquino o azida sustituido con ^{18}F , o alquino o azida sustituido con ^{19}F .

7. Un bioconjugado que comprende:

(i) una biomolécula que comprende al menos un grupo tiol; y

(ii) un conector conjugado al grupo tiol de dicha biomolécula;

en donde el conector es:



5

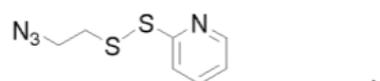
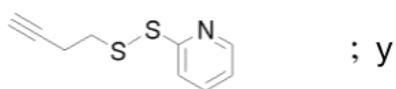
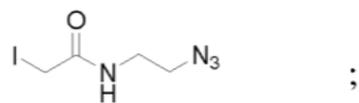
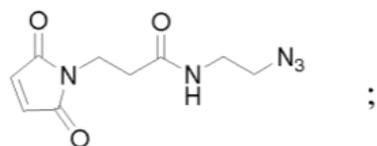
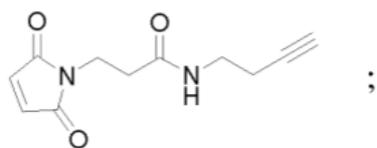
y se prepara mediante un método que comprende hacer reaccionar un compuesto amina que comprende un grupo funcional que reacciona con alquino o azido con un ácido carboxílico o un éster activado que comprende un grupo funcional que reacciona con tiol.

10 8. El bioconjugado de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el éster activado comprende una estructura: L-M-COR²; en donde L comprende un grupo funcional que reacciona con tiol, o un derivado protegido del mismo; M es una unidad conectora divalente; y R² es OH o un grupo activador.

9. El bioconjugado de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el compuesto amina comprende una estructura: G-J-R¹; en donde G es una amina, J es una unidad conectora divalente, y R¹ es un grupo funcional que reacciona con alquino o azido.

15 10. El bioconjugado de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la biomolécula es un anticuerpo.

11. Un conector seleccionado del grupo que consiste en:



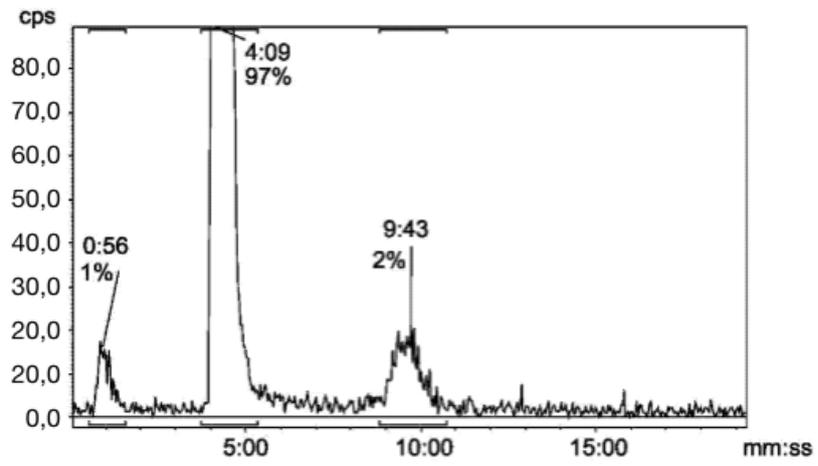


FIG. 1A

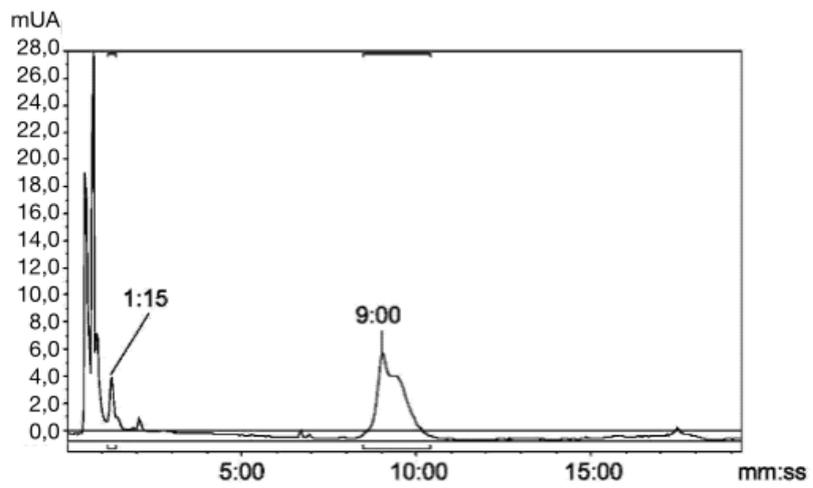


FIG. 1B

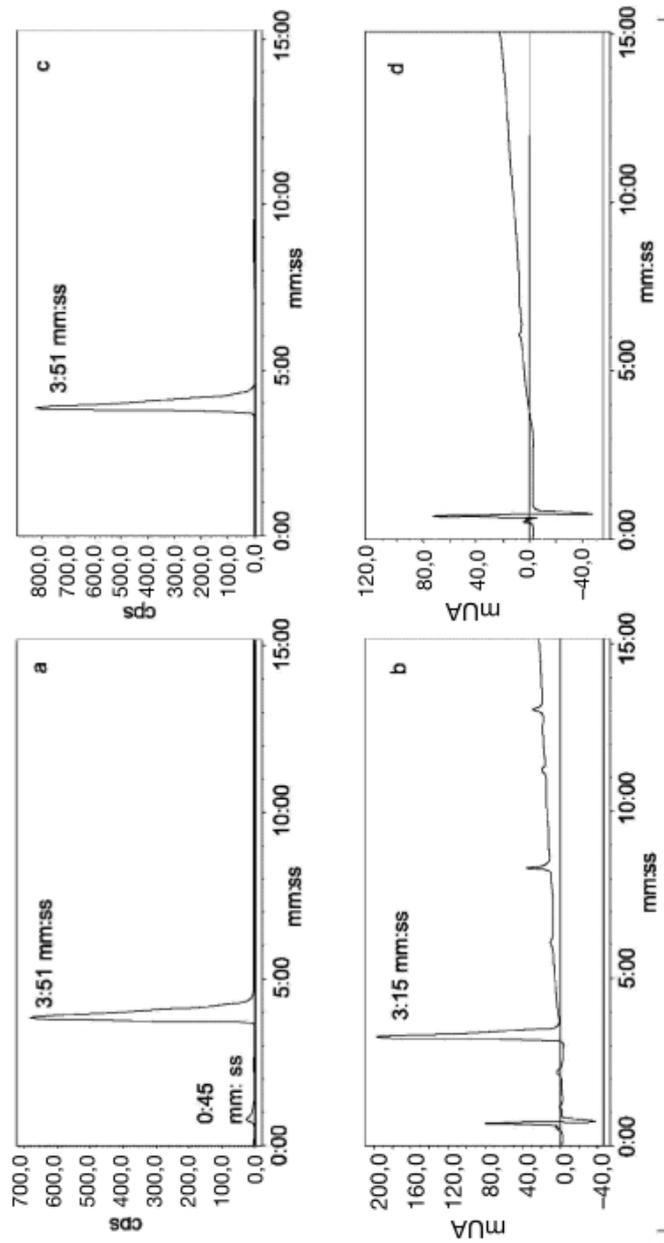


FIG. 2

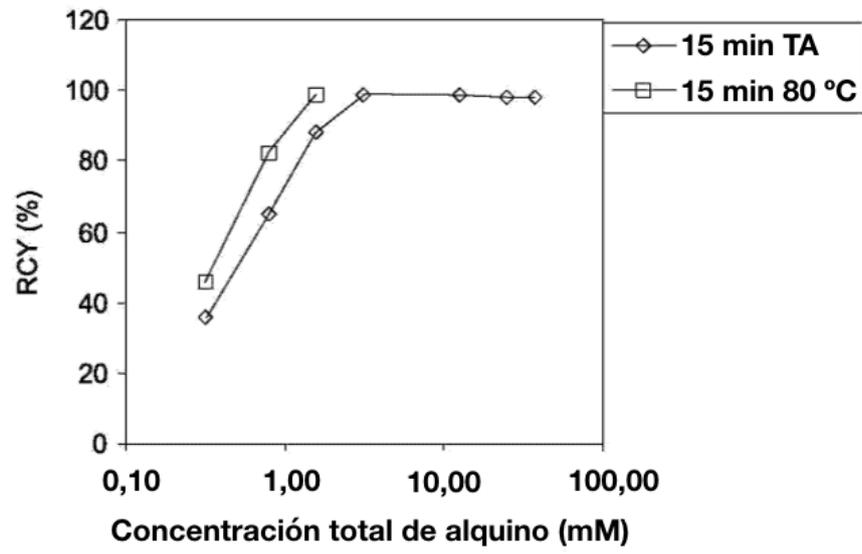


FIG. 3

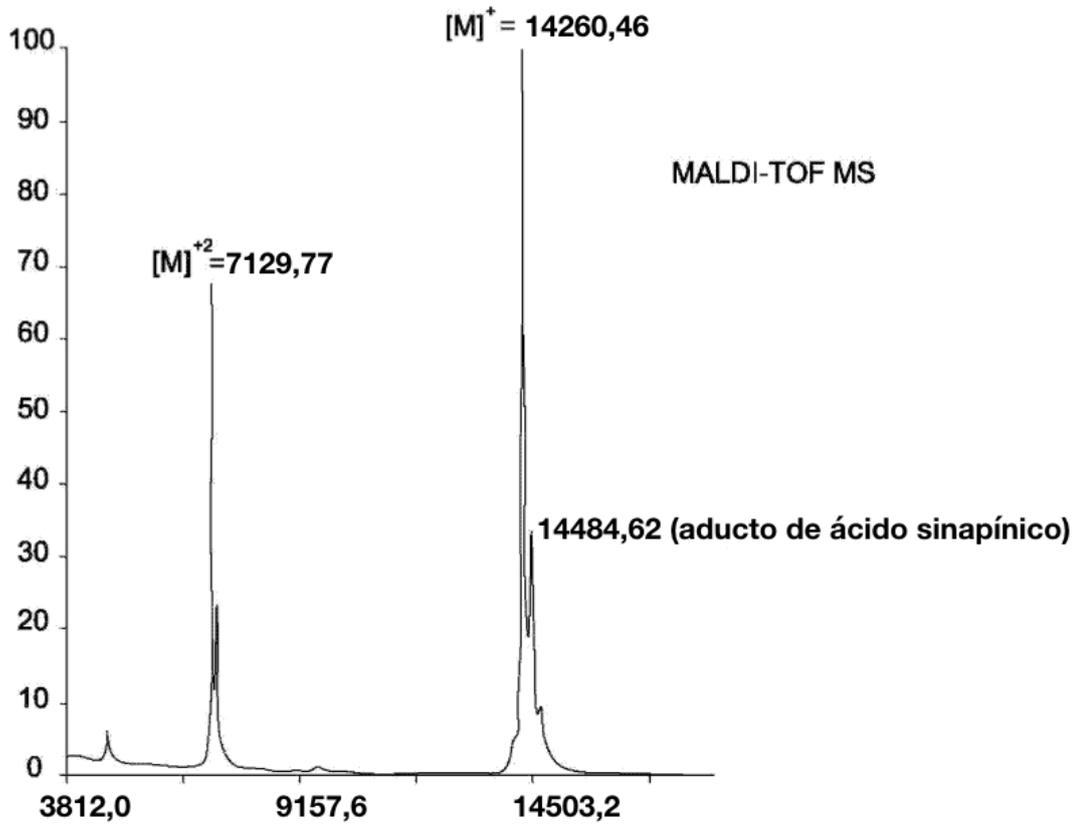


FIG. 4

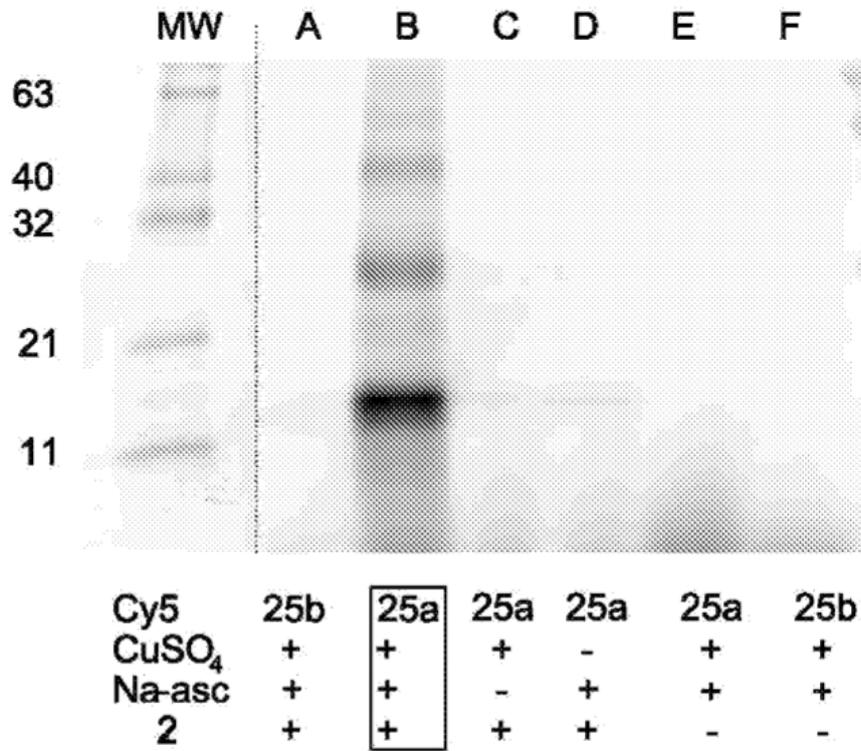


FIG. 5