

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 538**

51 Int. Cl.:

**A61K 51/04** (2006.01)

**A61K 47/68** (2007.01)

**B82Y 5/00** (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2010 PCT/IB2010/051565**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.10.2010 WO10119389**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2010 E 10717257 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 2419142**

54 Título: **Kit de predireccionamiento, método y agentes que se usan en éste**

30 Prioridad:

**16.04.2009 EP 09158058**

**29.10.2009 EP 09174489**

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

**26.06.2020**

73 Titular/es:

**TAGWORKS PHARMACEUTICALS B.V. (100.0%)  
Vondellaan 11  
5611 NX Eindhoven , NL**

72 Inventor/es:

**ROBILLARD, MARC, S.;  
ROSSIN, RAFFAELLA;  
LUB, JOHAN;  
RENART VERKERK, PASCAL y  
BURDINSKI, DIRK**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 769 538 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

Kit de predireccionamiento, método y agentes que se usan en éste

5

La invención se refiere a un método de predireccionamiento, para formación de imágenes médicas y/o terapéuticas dirigidas, en el que se hace uso de grupos químicos reactivos abióticos que exhiben reactividad bioortogonal unos con respecto a los otros. La invención se refiere además a un kit de predireccionamiento que comprende al menos una sonda de predireccionamiento y al menos una sonda efectora, en el que la sonda de predireccionamiento comprende una fracción de direccionamiento primaria y un primer grupo reactivo bioortogonal, y en el que la sonda efectora comprende una fracción efectora, tal como un marcador o un compuesto farmacéuticamente activo, y un segundo grupo reactivo bioortogonal. La invención se refiere además a agentes de predireccionamiento que se usan en el método y el kit que se mencionan anteriormente. La invención se refiere de manera particular a la formación de imágenes nuclear y radioterapia.

10

15

Antecedentes de la invención

En muchas áreas de diagnóstico médico y terapia, resulta conveniente el suministro de un agente de manera selectiva, tal como un agente terapéutico (un fármaco) o un agente de diagnóstico (por ejemplo, por imágenes) a un sitio específico, o una región limitada, en el cuerpo de un sujeto tal como un paciente.

20

El direccionamiento activo de un órgano o un tejido se logra mediante la conjugación directa o indirecta de las fracciones activas convenientes (por ejemplo, un agente potenciador de contraste o un compuesto citotóxico) en un constructo de direccionamiento, que se une a superficies celulares o promueve la absorción celular en o el sitio diana de interés. Las fracciones de direccionamiento que se usan para dirigirse a dichos agentes son normalmente constructos que tienen afinidad por dianas de superficie celular (por ejemplo, receptores de membrana), proteínas estructurales (por ejemplo, placas amiloides), o dianas intracelulares (por ejemplo, ARN, ADN, enzimas, vías de comunicación celular). Estas fracciones pueden ser anticuerpos (fragmentos), proteínas, aptámeros, oligopéptidos, oligonucleótidos, oligosacáridos, así como también péptidos, peptoides, y compuestos de fármacos orgánicos que, según se conoce, se acumulan en una enfermedad o disfunción particular. De manera alternativa, un agente de contraste/terapéutico puede dirigirse a una vía metabólica, que se regula positivamente durante una enfermedad (como infección o cáncer) tal como ADN, proteínas, y síntesis de membrana y absorción de carbohidratos. En tejidos enfermos, los marcadores que se mencionan anteriormente pueden discriminar células enfermas de los tejidos sanos y ofrecer posibilidades únicas para detección temprana, diagnóstico específico y terapia (dirigida).

25

30

35

Un criterio importante para agentes de formación de imágenes/terapia molecular exitosos en general y agentes de formación de imágenes/terapia nucleares en particular consiste en que estos exhiben una absorción de diana elevada que muestra una depuración rápida (a través de los sistemas renal y/o hepatobiliar) del de tejido no diana y de la sangre. Sin embargo, esto es frecuentemente problemático: por ejemplo, estudios de imágenes en humanos han demostrado que la concentración máxima de un anticuerpo radiomarcado en el sitio del tumor se logra en 24 h pero se requieren algunos días más para que la concentración del anticuerpo marcado en circulación disminuya a niveles lo suficientemente bajos como para lograr la formación de imágenes exitosa.

40

45

Estos problemas (especialmente para formación de imágenes y terapia nucleares) con una acumulación lenta o insuficiente en el tejido diana y depuración lenta de las áreas no dianas ha conducido a la aplicación de enfoques de predireccionamiento.

El predireccionamiento se refiere a una etapa en un método de direccionamiento, en el que una diana primaria (por ejemplo, una superficie celular) se proporciona con una sonda de predireccionamiento. Esta última comprende una diana secundaria, a la que se dirigirá eventualmente otra sonda (la sonda efectora) que se equipa con una fracción de direccionamiento secundaria.

50

De este modo, en el predireccionamiento, una sonda de predireccionamiento se une a una diana primaria. La sonda de predireccionamiento transporta, además, dianas secundarias, que facilitan la conjugación específica con un agente de diagnóstico (por imágenes) y/o terapéutico, la sonda efectora. Después de que el constructo que forma la sonda de predireccionamiento se ha posicionado en el sitio diana (tiempo de demora, por ejemplo, 24 h), puede usarse un agente de depuración para retirar el exceso de la sangre, si la depuración natural no es suficiente. En una segunda etapa de incubación (que demora preferiblemente un tiempo más breve, por ejemplo, 1-6 horas), la sonda efectora se une a la sonda de predireccionamiento (pre)unida mediante su fracción de direccionamiento secundaria. La diana secundaria (que se presenta en la sonda de predireccionamiento) y la fracción de direccionamiento secundaria (que se presenta en la sonda efectora) deberían unirse rápidamente, con alta especificidad y alta afinidad y deberían ser estables en el cuerpo.

55

60

El concepto general de predireccionamiento se indica para formación de imágenes en la Fig. 1. En la presente, la sonda efectora es una sonda de formación de imágenes que comprende un marcador detectable para una modalidad de formación de imágenes. La sonda efectora se une a la sonda de predireccionamiento (pre)unida mediante sus grupos de direccionamiento secundarios.

65

Ejemplos comunes de diana secundaria/pares de fracciones de direccionamiento secundarias son sistemas de biotina/estreptavidina o anticuerpo/antígeno. Para resultar efectiva, la sonda efectora debe expulsarse del cuerpo rápidamente (por ejemplo, a través de los riñones) para proporcionar la acumulación tumoral alta conveniente con acumulación no diana relativamente baja. Por lo tanto, estas sondas son normalmente pequeñas.

En la formación de imágenes nuclear y radioterapia, el concepto de predireccionamiento es adicionalmente ventajoso, ya que la etapa de predireccionamiento que consume tiempo puede llevarse a cabo usando radionúclidos, mientras que la etapa de direccionamiento secundaria, usando un radionúclido se puede llevar a cabo más rápido. Esta última permite el uso de radionúclidos de vida más corta con la ventaja de minimizar la dosis de radiación al paciente y, por ejemplo, el uso de agentes de PET en lugar de agentes de SPECT. Además, de manera general, este enfoque facilita el uso de un agente de contraste universales.

Las entidades que llevan a cabo interacciones altamente selectivas en biología en general (como anticuerpo-antígeno), y en predireccionamiento en particular (biotina-estreptavidina, anticuerpo/haptenos, oligonucleótidos antisentido), son muy grandes. Como resultado, el predireccionamiento con péptidos y fracciones orgánicas pequeñas como grupos de direccionamiento primarios, así como también formación de imágenes metabólicas y formación de imágenes de dianas intracelulares, han permanecido fuera del alcance ya que el tamaño de las dianas secundarias hace que el uso de grupos primarios pequeños sea inútil.

Además, los sistemas de predireccionamiento actuales se encuentran obstaculizados por factores asociados con su naturaleza biológica. La biotina es una molécula endógena y sus conjugados pueden cortarse mediante la enzima en suero biotidinasas. Cuando se usa predireccionamiento antisentido, los oligonucleótidos pueden ser objeto del ataque de ARNasa y ADNasa. Las proteínas y péptidos pueden someterse también a las vías de descomposición naturales. Estas interacciones pueden perjudicarse de manera adicional mediante su naturaleza dinámica y no covalente y tiempo de residencia en diana limitado. Como resultado, el tiempo entre la adición de los dos componentes en el predireccionamiento es limitado, lo que puede conducir a proporciones de diana con respecto a no diana inferiores a las óptimas. Además, la biotina endógena compite con los conjugados de biotina en cuanto a la unión con estreptavidina. Finalmente, la estreptavidina es altamente inmunogénica.

Un desarrollo reciente consiste en evitar las desventajas que se asocian con el predireccionamiento exclusivamente en base a constructos naturales/de direccionamiento biológico (a saber, biotina/estreptavidina, anticuerpo/hapteno, oligonucleótidos antisentido).

A este respecto, se puede hacer referencia al documento WO 2006/038185 como una divulgación de un método de predireccionamiento, para formación de imágenes médicas y/o terapéuticas dirigidas, en el que se hace uso de grupos químicos reactivos abióticos que exhiben reactividad ortogonal unos con respecto a los otros. Haciendo referencia a esto, los grupos reactivos bioortogonales son las parejas de reacción en una ligación de Staudinger, a saber, una azida y una fosfina. La selección que se describe de la ligación de Staudinger como la química de acoplamiento en el predireccionamiento da como resultado la disponibilidad de parejas reactivas que son abióticas, que forman un aducto estable en condiciones fisiológicas, y que se reconocen solamente unas con respecto a la otras, mientras que ignoran sus alrededores celulares/fisiológicos (a saber, son bioortogonales).

Otra referencia en cuanto al uso, en un método de predireccionamiento de grupos químicos reactivos abióticos que exhiben reactividad ortogonal unos con respecto a otros, se incluye en el documento WO 2007/039858. En la presente, los grupos reactivos bioortogonales son las parejas de reacción en una cicloadición [3+2] de azidas - alquinos.

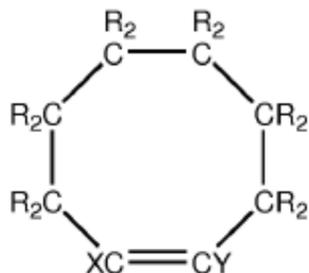
Otro tipo de química de acoplamiento se describe por Neal K. Devaraj, Ralph Weissleder, y Scott Hilderbrand en Bioconjugate Chem. 2008, 19, 2297-2299. Esta se refiere a la aplicación de cicloadiciones de tetrazina bioortogonal para marcaje de células vivas. Las parejas de reacción en la presente son 3-(p-bencilamino)-1,2,4,5-tetrazina y un norborneno, a saber, ácido (1S,2S,4S)-biciclo[2,2,1]hept-5-en-2-il acético, que se someten a cicloadición Diels-Alder continuando con reacción retro Diels-Alder, en la que se libera dinitrógeno (N<sub>2</sub>). Esta química de acoplamiento se denomina también como una reacción Diels-Alder con demanda inversa de electrones. Se hace referencia al predireccionamiento de células SKBR3 de cáncer de mama humano por el anticuerpo monoclonal trastuzumab (herceptin) que se marca con norborneno, continuando con el marcaje de células con tetrazina unida con la sonda fluorescente VT680 casi infrarroja.

Los tipos de química de acoplamiento anteriores, a pesar de ser útiles, deben mejorarse aún más. Esto, *inter alia*, en se refiere a se necesitan concentraciones lo suficientemente altas de reactivos. En particular, esto significa que las sondas efectoras, con el fin de unirse lo suficiente a las sondas de predireccionamiento, requieren un tiempo de circulación relativamente prolongado y/o alta concentración. Resulta conveniente ser capaz de reducir la concentración necesaria de las sondas efectoras, mientras que se retienen las ventajas del método de predireccionamiento bioortogonal que se menciona anteriormente.

Además, en particular con referencia a la aplicación de formación de imágenes nuclear y radioterapia, resulta conveniente presentar una química de acoplamiento bioortogonal eficiente.

## Sumario de la invención

5 Con el fin de abordar de mejor manera las conveniencias anteriores, la invención, en un aspecto, proporciona un kit para formación de imágenes médicas y/o terapéuticas dirigidas, que comprende al menos una sonda de predireccionamiento y al menos una sonda efectora, en el que la sonda de predireccionamiento comprende una fracción de direccionamiento primaria y un primer grupo reactivo bioortogonal, y el que la sonda efectora comprende una fracción efectora, tal como un marcador o un compuesto farmacéuticamente activo, y un segundo grupo reactivo bioortogonal, en el que cualquiera de los grupos reactivos bioortogonales primero y segundo es un dienófilo y el otro de los grupos reactivos bioortogonales primero y segundo es un dieno, en el que el dienófilo es un dienófilo con anillo de 8 miembros que cumple con la fórmula (1):



(1)

15 en la que cada R indica de manera independiente H, o, en un máximo de seis casos, un sustituyente que se selecciona a partir del grupo que consiste en alquilo, O-alquilo, S-alquilo, F, Cl, Br, I, SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, NR'R'' con R' y R'' siendo cada uno de manera independiente H o alquilo, C(=O)Oalquilo, C(=O)Oarilo, CONR'R'' con R' y R'' siendo cada uno de manera independiente H, arilo o alquilo, OCOalquilo, OCOarilo, NR'COalquilo con R' siendo H o alquilo, NR'COarilo con R' siendo o alquilo, NR'C(=O)Oalquilo con R' siendo H o alquilo, NR'C(=O)Oarilo con R' siendo H o alquilo, OCONR'alquilo con R' siendo H o alquilo, OCONR'arilo con R' siendo H o alquilo, NR'CONR'alquilo con R' y R'' siendo cada uno de manera independiente H o alquilo, NR'CONR'arilo con R' y R'' siendo cada uno de manera independiente H o alquilo, y NR'CSNR'' alquilo con R' y R'' siendo cada uno de manera independiente H o alquilo, y NR'CSNR'' arilo con R' y R'' siendo cada uno de manera independiente H o alquilo; con al menos un R comprendido en una fracción ligadora, de manera opcional a través de un espaciador, a la sonda de predireccionamiento o a la sonda efectora, y en la que X e Y indican de manera independiente H, o un sustituyente que se selecciona a partir del grupo que consiste en alquilo, O-alquilo, S-alquilo, F, Cl, Br, I, SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> y NRR' con R y R' siendo cada uno de manera independiente H o alquilo, o formando en conjunto un enlace; y en la que el dieno se selecciona para que sea capaz de reaccionar con el dienófilo al someterse a cicloadición Diels-Alder continuando con una reacción retro Diels-Alder, y en la que el dieno cumple con la fórmula

(7)

35 en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> indican cada uno de manera independiente un sustituyente que se selecciona a partir del grupo que consiste en 2-piridilo, fenilo o fenilo que se sustituye con uno o más grupos de extracción de electrones como NO<sub>2</sub>, CN, COOH, COOR, CONH<sub>2</sub>, CONHR, CONR<sub>2</sub>, CHO, COR, SO<sub>2</sub>R, SO<sub>2</sub>OR, NO y Ar, en donde R es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y Ar representa un grupo aromático, en particular fenilo, piridilo o naftilo.

40 En otro aspecto, la invención proporciona un método de predireccionamiento, así como también agentes de predireccionamiento que se usan en éste, y formación de imágenes o terapia dirigida en el que se usa este kit.

En otro aspecto más, la invención es un compuesto que cumple con la fórmula (1), para uso en un método de predireccionamiento en un animal o ser humano.

## 45 Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá con respecto a realizaciones particulares y con referencia a determinados dibujos pero la invención no se limita a ellos, haciéndolo solo a las reivindicaciones. Cualquier signo de referencia en las reivindicaciones no deberá interpretarse como limitante del alcance. Los dibujos que se describen son solamente esquemáticos y no limitantes. En los dibujos, el tamaño de algunos de los elementos puede exagerarse y no dibujarse a escala con fines ilustrativos. Cuando la expresión "que comprende" se usa en la presente descripción y reivindicaciones, esta no excluye otros elementos o etapas. Cuando se usa un artículo definido o indefinido haciendo referencia a un sustantivo singular, por ejemplo, "un" o "una", "el/la", éste incluye un plural de ese sustantivo a menos que se indique específicamente otra cosa.

55

Se debe tener en cuenta, además, que la expresión “que comprende”, que se usa en la descripción y las reivindicaciones no debería interpretarse como restringida a los significados que se enumeran de aquí en adelante, esta no excluye otros elementos o etapas. De este modo, el alcance de la expresión “un dispositivo que comprende medios A y B” no debería limitarse a los dispositivos que consisten solamente en los componentes A y B. Esto significa que con respecto a la presente invención, los componentes relevantes del dispositivo son solamente A y B.

En varias fórmulas químicas se hace referencia a “alquilo” y “arilo”. A este respecto, “alquilo”, cada uno de manera independiente, indica un grupo alquilo alifático, de cadena lineal o ramificada, cíclico de hasta diez carbonos, que incluye posiblemente 1-3 heteroátomos tales como O, N, o S y preferiblemente de 1-6 átomos de carbono y “arilo”, cada uno de manera independiente, indica un grupo aromático o heteroaromático de hasta diez átomos de carbono, incluyendo posiblemente 1-3 heteroátomos tales como N o S. En varias fórmulas, grupos o sustituyentes se indican con referencia a letras tales como “A”, “B”, “X”, “Y”, y diversos grupos “R” enumerados. Las definiciones de estas letras se pueden leer con referencia a cada fórmula, a saber, en diferentes fórmulas, estas letras tienen, cada una de manera independiente, significados diferentes a menos que se indique lo contrario.

#### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 represente un esquema general de un concepto de predireccionamiento, según se analiza anteriormente;

La Fig. 2 proporciona el esquema de reacción para una reacción Diels-Alder de tipo [4+2]; entre (3,6)-di-(2-piridil)-s-tetrazina y E-ciclooctano continuando con una reacción retro Diels-Alder en la se forman el producto y nitrógeno. Debido a que el derivado trans-ciclooctano no contiene grupos de extracción de electrones como en la reacción Diels-Alder clásica, este tipo de reacción Diels-Alder se diferencia con respecto a la clásica, y recibe frecuentemente la denominación de “reacción Diels-Alder con demanda inversa de electrones” En el siguiente texto, la secuencia de ambas etapas de reacción, a saber, la cicloadición Diels-Alder inicial (normalmente una cicloadición Diels-Alder con demanda inversa de electrones) y la reacción Diels-Alder posterior se referirán para abreviar como “reacción retro Diels-Alder”.

La Fig. 3 (a y b) representa esquemas generales para predireccionamiento usando química retro Diels-Alder;

La Fig. 4 a Fig. 7 ilustran esquemas de síntesis para compuestos que se usan en los ejemplos.

Las Figs. 8-9 ilustran esquemas de síntesis para compuestos que se usan en el ejemplo *in vivo*.

Las Figs. 10-12 ilustran la viabilidad *in vivo* de la presente invención.

#### Descripción detallada de las realizaciones

##### Reacción retro Diels-Alder

La química de acoplamiento retro Diels-Alder incluye de manera general un par de reactivos que se acoplan para formar un producto intermedio no estable, eliminando dicho producto intermedio una molécula pequeña (dependiendo de los compuestos de partida, esta puede ser, por ejemplo, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, RCN, como el subproducto único a través de una reacción retro Diels-Alder para formar un producto estable. Los reactivos en pareja comprenden, como un reactivo (a saber, un grupo reactivo bioortogonal) un derivado de tetrazina, y, como el otro reactivo (a saber, el otro grupo reactivo bioortogonal), un ciclooctano de acuerdo con la fórmula (1).

La química de acoplamiento retro Diels-Alder incluye de manera general un par de reactivos que se acoplan para formar un producto intermedio no estable, rediseñándose dicho producto intermedio como un aducto estable a través de una reacción retro Diels-Alder. Los reactivos en pareja comprenden, como un reactivo (a saber, un grupo reactivo bioortogonal), un dieno tal como una tetrazina deficiente de electrones, o similares, y, como el otro reactivo (a saber, el otro grupo reactivo bioortogonal), un ciclooctano tensionado de acuerdo con la fórmula (1).

La reacción excepcionalmente rápida de, por ejemplo, tetrazinas (sustituidas) deficientes de electrones con, por ejemplo, E-ciclooctano tensionado da como resultado un producto intermedio de ligación que se redispone como una dihidropiridazina estable mediante la eliminación de N<sub>2</sub> como el único subproducto en una cicloadición retro Diels-Alder de tipo [4+2]. Esto se muestra en la Fig. 2.

Las dos especies reactivas son abióticas y, de este modo, no se someten a un metabolismo rápido *in vivo*. Son bioortogonales, por ejemplo, reaccionan de manera selectiva una con respecto a la otra en medios fisiológicos.

Entre las referencias a la reacción Diels-Alder con demanda inversa de electrones, y el comportamiento del par de especies reactivas se incluyen: Thalhammer, F; Wallfahrer, U; Sauer, J, Tetrahedron Letters, 1990, 31 (47), 6851-6854; Wijnen, JW; Zavarise, S; Engberts, JBFN, Journal Of Organic Chemistry, 1996, 61, 2001-2005; Blackman, ML; Royzen, M; Fox, JM, Journal Of The American Chemical Society, 2008, 130 (41), 13518-19).

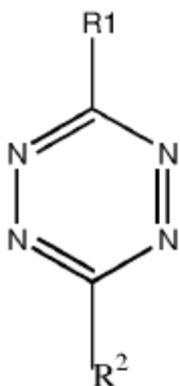
Debería comprenderse que, en un sentido amplio, de acuerdo con la invención, la química de acoplamiento que se menciona anteriormente puede aplicarse a básicamente cualquier par de moléculas, grupos, o fracciones que pueden usarse en predireccionamiento. A saber, una de un par como tal comprenderá una fracción de direccionamiento primaria, que puede unirse a una diana primaria, y que comprende, además, al menos una diana secundaria. La otra será una fracción de direccionamiento secundaria que resulta adecuada para uso en la unión a dicha diana secundaria, y que comprende, además, una fracción adecuada para ejercer una acción terapéutica (normalmente un compuesto farmacéuticamente activo), o para ser abordada en una técnica de formación de imágenes (a saber, un marcador), o ambas.

De este modo, de acuerdo con la invención, cualquiera de la sonda de predireccionamiento y la sonda efectora se funcionaliza con un ciclooctano, y la otra se funcionaliza con una tetrazina. Esto se ilustra en la Fig. 3. El esquema de arriba (Fig. 3a) indica una sonda de predireccionamiento que comprende dipiridil tetrazina ligada, mediante una fracción ligadora (que comprende preferiblemente un espaciador flexible) a un anticuerpo como la fracción de direccionamiento primaria, y una sonda efectora que comprende un ciclooctano (como la fracción de direccionamiento secundaria) ligada, mediante un ligador (un espaciador flexible) a un marcador detectable. El esquema de abajo (Fig. 3b) muestra exactamente lo opuesto, a saber, una sonda de predireccionamiento que comprende el ciclooctano y una sonda efectora que comprende la tetrazina.

La persona experta en la técnica conoce el valor de los dienos que son reactivos en la reacción retro Diels-Alder. Los dienos de la invención se indican a continuación, con referencia a la fórmula (7).

Derivados de tetrazina particularmente útiles son tetrazinas deficientes de electrones, a saber, tetrazinas que se sustituyen con grupos o fracciones que no se mantienen de manera general como donantes de electrones, y que transportan preferiblemente sustituyentes de extracción de electrones.

Estas tetrazinas deficientes de electrones cumplen con la siguiente fórmula estructural:



(7)

En la presente, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> indican cada uno de manera independiente un sustituyente que se selecciona a partir del grupo que consiste en 2-piridil, fenilo, o fenilo que se sustituye con uno o más grupos de extracción de electrones tales como NO<sub>2</sub>, CN, COOH, COOR, CONH<sub>2</sub>, CONHR, CONR<sub>2</sub>, CHO, COR, SO<sub>2</sub>R, SO<sub>2</sub>OR, NO, Ar, en la que R es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y Ar representa un grupo aromático, en particular fenilo, piridilo o naftilo.

En los compuestos de acuerdo con la fórmula (7), los grupos R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> pueden proporcionarse además con un ligador o fracciones separadoras adecuadas según se analiza a continuación. De manera análoga, e independientemente de esto, el dienófilo de fórmula (1) también puede proporcionarse con un ligador o fracciones separadoras adecuadas según se analiza a continuación.

El dienófilo es preferiblemente un E-ciclooctano.

Una ventaja de hacer uso de la reacción retro Diels-Alder de tipo [4+2] en una estrategia de predireccionamiento consiste en que ambos el dieno y el ciclooctano o ciclooctino son abióticos y esencialmente no reactivos con respecto a biomoléculas en el interior o en la superficie de células y en todas las otras regiones como suero, etc. De este modo, los compuestos y el método de la invención pueden usarse en una célula, tejido u organismo vivo. Además, los grupos reactivos son relativamente pequeños y pueden introducirse en muestras biológicas u organismos vivos sin alterar significativamente el tamaño biológico. Usando la reacción retro Diels-Alder de tipo [4+2], resulta posible unir fracciones de direccionamiento primarias que son de tamaño grande, por ejemplo, anticuerpos, con marcadores u otras moléculas usando parejas de reacción pequeñas, por ejemplo, tetrazina o ciclooctano. Incluso más ventajoso, las fracciones de direccionamiento primarias pueden unirse, las que son relativamente pequeñas, por ejemplo, péptidos, con marcadores u otras moléculas usando (se emparejan) parejas de reacción relativamente pequeñas, por

ejemplo, tetrazina y ciclooctano. El tamaño y propiedades de la sonda de predireccionamiento y sonda efectora no se ven afectados en gran medida por la diana secundaria y la fracción de direccionamiento secundaria, permitiendo que se usen los esquemas de (pre)direccionamiento para fracciones de direccionamiento pequeñas. Debido a esto, otros tejidos pueden dirigirse, a saber, el destino de las sondas no se limita al sistema vascular y espacio intersticial, como es el caso del predireccionamiento actual con anticuerpo-estreptavidina. De acuerdo con una realización, la invención se usa para formación de imágenes dirigidas.

De acuerdo con esta realización, la formación de imágenes de una diana primaria específica se logra mediante la unión específica de la fracción de direccionamiento primaria de la sonda de predireccionamiento y la detección de esta unión usando marcadores detectables comprendidos en la sonda efectora.

#### Diana primaria

Una "diana primaria" según se usa en la presente invención se refiere a una diana para detectarse en un método de diagnóstico y/o de formación de imágenes, y/o para modularse, unirse, o, de otra manera, abordarse por un compuesto farmacéuticamente activo, u otra modalidad terapéutica.

La diana primaria puede seleccionarse a partir de cualquiera de las dianas adecuadas en el cuerpo humano o animal o en un patógeno o parásito, por ejemplo, un grupo que comprende células tales como membranas celulares y paredes celulares, receptores tales como receptores de membrana celular, estructuras intracelulares tales como aparatos de Golgi o mitocondrias, enzimas, receptores, ADN, ARN, virus o partículas virales, anticuerpos, proteínas, carbohidratos, monosacáridos, polisacáridos, citocinas, hormonas, esteroides, receptor de somatostatina, monoaminooxidasa, receptores muscarínicos, sistema nervioso simpático miocárdico, receptores de leucotrienos, por ejemplo, en leucocitos, receptor activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPAR), receptor de folato, marcador de apoptosis, marcador de (anti-)angiogénesis, receptor de gastrina, sistema dopaminérgico, sistema serotoninérgico, sistema GABAérgico, sistema adrenérgico, sistema colinérgico, receptores opioides, receptor GPIIb/IIIa y otros receptores relacionados con trombos, fibrina, receptor de calcitonina, receptor de tuftsin, receptor de integrina, receptores de VEGF/EGF, metaloproteinasas de matriz (MMP), receptor de selectina P/E/L, receptor de LDL, glicoproteína P, receptores de neurotensina, receptores de neuropéptidos, receptores de sustancia P, receptor NK, receptores CCK, receptores sigma, receptores de interleucina, tirosina quinasa del virus del herpes simple, tirosina quinasa humana

De acuerdo con una realización particular de la presente invención, la diana primaria es una proteína tal como un receptor. De manera alternativa, la diana primaria puede ser una vía metabólica, que se regula positivamente durante una enfermedad, por ejemplo infección o cáncer, tales como síntesis de ADN, síntesis de proteína, síntesis de membrana y absorción de carbohidratos. En tejidos enfermos, los marcadores que se mencionan anteriormente pueden diferenciarse con respecto a un tejido sano y ofrecer posibilidades únicas para detección temprana, diagnóstico y terapia específicos, especialmente terapia dirigida.

#### Sonda de predireccionamiento

Una sonda de predireccionamiento comprende una fracción que resulta capaz de unirse a la diana primaria de interés.

Las fracciones de direccionamiento son normalmente constructos que tienen afinidad por dianas de superficies celulares (por ejemplo, receptores de membrana), proteínas estructurales (por ejemplo, placas amiloides), o dianas intracelulares (por ejemplo, ARN, ADN, enzimas vías de comunicación celular). Estas fracciones pueden ser anticuerpos (fragmentos), proteínas, aptámeros, oligopéptidos, oligonucleótidos, oligosacáridos, así como también, péptidos, peptoides, y compuestos de fármacos orgánicos que, según se conoce, se acumulan en una enfermedad o disfunción particular.

Realizaciones particulares o fracciones de direccionamiento primarias adecuadas para uso en los kits de la presente invención se describen en la presente e incluyen péptidos de unión a receptores y anticuerpos. Una realización particular de la presente invención se refiere al uso de fracciones de direccionamiento pequeñas, tales como péptidos, de manera tal que se obtiene una sonda de direccionamiento permeable con respecto a las células.

Una "fracción de direccionamiento primaria" según se usa en la presente invención se refiere a la parte de la sonda de direccionamiento que se une a una diana primaria. Ejemplos particulares de fracciones de direccionamiento primarias son péptidos o proteínas que se unen a un receptor. Otros ejemplos de fracciones de direccionamiento primaria son anticuerpos o fragmentos de estos que se unen a un compuesto celular. Los anticuerpos pueden presentarse como compuestos no proteínicos así como también como proteínas o péptidos. Otras fracciones de direccionamiento primarias pueden estar constituidas de aptámeros, oligopéptidos, oligonucleótidos, oligosacáridos, así como también peptoides y compuestos de fármacos orgánicos. Una fracción de direccionamiento primaria se une preferiblemente con alta especificidad, con una alta afinidad y la unión con la diana primaria es preferiblemente estable en el cuerpo.

Con el fin de permitir el direccionamiento específico de las dianas primarias que se mencionan anteriormente, la fracción de direccionamiento primaria de la sonda de direccionamiento puede comprender compuestos que incluyen

- 5 pero sin limitación, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, Fab2, Fab, scFv, polímeros (direccionamiento del tumor en virtud del efecto EPR), proteínas, péptidos, por ejemplo, octreótido y derivados, VIP, MSH, LHRH, péptidos quimiotácticos, bombesina, elastina, péptidos miméticos, carbohidratos, monosacáridos, polisacáridos, virus, fármacos, agentes quimioterapéuticos, agonistas y antagonistas de los receptores, citocinas, hormonas, esteroides. Ejemplos de compuestos orgánicos previstos en el contexto de la presente invención son, o derivan de, estrógenos, por ejemplo, estradiol, andrógenos, progestinas, corticosteroides, paclitaxel, etopósido, doxorubicina, metotrexato, ácido fólico y colesterol.
- 10 De acuerdo con una realización particular de la presente invención, la diana primaria es un receptor y fracciones de direccionamiento primarias adecuadas incluyen el ligando de un receptor como tal o una parte de éste que se une todavía al receptor, por ejemplo, un péptido de unión a receptor en el caso de los ligandos de proteínas de unión a receptores.
- 15 Otros ejemplos de fracciones de direccionamiento primaria de naturaleza proteica incluyen, por ejemplo, interferones alfa, beta, y gamma, interleucinas, y factor de crecimiento de proteínas, tales como factor de crecimiento tumoral, por ejemplo, factor de crecimiento tumoral alfa, beta, gamma, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), proteína de direccionamiento a uPAR, apolipoproteína, LDL, anexina V, endostatina, y angiostatina.
- 20 Ejemplos alternativos de fracciones de direccionamiento primarias incluyen ADN, ARN, ANP, ANL que son, por ejemplo, complementarios a la diana primaria.
- 25 De acuerdo con una realización en particular de la invención, se usan fracciones de direccionamiento primarias lipofílicas pequeñas, las que pueden unirse con una diana primaria intracelular.
- 30 De acuerdo con una realización particular adicional de la invención, la diana primaria y la fracción de direccionamiento primaria se seleccionan para dar como resultado un direccionamiento específico o aumentado de un tejido o enfermedad, tales como cáncer, una inflamación, una infección, una enfermedad cardiovascular, por ejemplo, trombo, lesión aterosclerótica, sitio hipóxico, por ejemplo, accidente cerebrovascular, tumor, trastorno cardiovascular, trastorno cerebral, apoptosis, angiogénesis, un órgano, y gen/enzima reportero. Esto se puede lograr mediante la selección de dianas primarias con expresión específica en tejido, célula o enfermedad. Por ejemplo, receptores de membrana de ácido fólico median la acumulación intracelular de folato y sus análogos, tal como el metotrexato. La expresión es limitada en tejidos normales, pero los receptores se sobreexpresan en diversos tipos de células tumorales.
- 35 De acuerdo con una realización, la sonda de predireccionamiento y la sonda efectora pueden ser compuestos multiméricos, que comprenden una pluralidad de dianas primarias y/o secundarias y/o fracciones de direccionamiento.
- 40 La sonda de predireccionamiento comprende además el primer grupo reactivo bioortogonal que se menciona anteriormente. Este grupo sirve como una "diana secundaria", a saber, como la parte de la sonda de direccionamiento que proporciona la primera pareja de reacción para la química de acoplamiento retro Diels-Alder.
- 45 Dicha diana secundaria puede ser cualquiera de la pareja de la reacción de acoplamiento, según se describe anteriormente. A saber, en una realización, es una tetrazina de extracción de electrones. En otra realización, es un ciclooctano tensionado. En la sonda de predireccionamiento, la fracción de direccionamiento primaria y el primer grupo reactivo bioortogonal pueden ligarse directamente uno con respecto al otro. Pueden unirse además uno con respecto al otro mediante un ligador, y ambos pueden ligarse, además, a un armazón de direccionamiento primario, por ejemplo, un biopolímero tal como un polipéptido. Fracciones ligadoras adecuadas incluyen, pero sin limitación, cadenas de polietilenglicol (PEG).
- 50 Sonda efectora
- 55 Una sonda efectora comprende una fracción efectora que resulta capaz de proporcionar el diagnóstico, la formación de imágenes, y/o el efecto terapéutico convenientes. La sonda efectora comprende además una fracción de direccionamiento secundaria.
- 60 La fracción de direccionamiento secundaria se relaciona con la parte de la sonda efectora que forma la pareja de reacción para la diana secundaria disponible, a saber, el grupo reactivo bioortogonal (o grupos) que están comprendidos en la sonda de predireccionamiento. Deberá comprenderse que, si la diana secundaria es un ciclooctano, la fracción de direccionamiento secundaria será una tetrazina, y viceversa.
- 65 La fracción efectora puede ser, por ejemplo, un marcador detectable. Un "marcador detectable" según se usa en la presente se refiere a la parte de la sonda efectora que permite la detección de la sonda, por ejemplo, cuando se presenta en una célula, tejido u organismo. Un tipo de marcador detectable previsto en el contexto de la presente invención es un agente que proporciona contraste. Diferentes tipos de marcadores detectables se prevén en el contexto de la presente invención y se describen en la presente a continuación.

De este modo, de acuerdo con una realización particular de la presente invención, los kits y métodos de predirecciónamiento de la presente invención se usan en la formación de imágenes, especialmente en la formación de imágenes médicas. Con el fin de identificar la diana primaria, se hace uso, como la sonda efectora, de una sonda de formación de imágenes que comprende uno o más marcadores detectables. Ejemplos articulares de marcadores detectables de la sonda de formación de imágenes son fracciones que proporcionan contraste que se usan en sistemas de formación de imágenes tradicionales, tales como constructos que pueden representarse en MRI, marcador espín, marcadores ópticos, constructos de respuesta a ultrasonidos, fracciones de respuesta a rayos X, radionúclidos, colorantes (bio)luminiscentes y de tipo FRET. Marcadores detectables de ejemplo, previstos en el contexto de la presente invención incluyen, pero sin limitación necesariamente, moléculas fluorescentes, por ejemplo, moléculas autofluorescentes, moléculas que emiten fluorescencia al contacto con un reactivo, etc., marcadores radioactivos; biotina, por ejemplo, para detectarse a través de la unión de biotina mediante avidina; etiquetas fluorescentes, constructos de formación de imágenes para IRM que comprenden metal paramagnético, reactivos de formación de imágenes, por ejemplo, aquellos que se describen en las patentes de E.E.U.U. nros. 4,741,900 y 5,326,856) y similares. El radionúclido que se usa para formación de imágenes puede ser, por ejemplo, un isótopo que se selecciona a partir del grupo que consiste en  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{52}\text{Mn}$ ,  $^{55}\text{Co}$ ,  $^{60}\text{Cu}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{62}\text{Zn}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{63}\text{Zn}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{70}\text{As}$ ,  $^{71}\text{As}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{74}\text{As}$ ,  $^{75}\text{Se}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{80}\text{Br}$ ,  $^{82}\text{Br}$ ,  $^{82}\text{Rb}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{88}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{110}\text{In}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{113}\text{In}$ ,  $^{114}\text{In}$ ,  $^{117}\text{Sn}$ ,  $^{120}\text{I}$ ,  $^{122}\text{Xe}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{167}\text{Tm}$ ,  $^{169}\text{Yb}$ ,  $^{193}\text{Pt}$ ,  $^{195}\text{Pt}$ ,  $^{201}\text{Tl}$ , y  $^{203}\text{Pb}$ .

Otros elementos e isótopos, tales como los que se usan para terapia, pueden aplicarse además para formación de imágenes en determinadas aplicaciones.

La fracción que puede representarse en MRI puede ser un ion paramagnético o una partícula superparamagnética. El ion paramagnético puede ser un elemento que se selecciona a partir del grupo que consiste en Gd, Fe, Mn, Cr, Co, Ni, Cu, Pr, Nd, Yb, Tb, Dy, Ho, Er, Sm, Eu, Ti, Pa, La, Sc, V, Mo, Ru, Ce, Dy, Tl. La fracción de respuesta a ultrasonido puede comprender una microburbuja, consistiendo la cubierta de esta de un fosfolípido, y/o polímero (biodegradable), y/o albúmina de suero humano. La microburbuja puede rellenarse con gases fluorados o líquidos.

Las fracciones de respuesta a rayos X incluyen, pero sin limitación, yodo, bario, sulfato de bario, gastrografina o pueden comprender una vesícula, liposoma o cápsula de polímero que se rellena con compuestos de yodo y/o sulfato de bario.

Además, los marcadores detectables previstos en el contexto de la presente invención pueden incluir además péptidos o polipéptidos que pueden detectarse mediante la unión de anticuerpos, por ejemplo, mediante la unión de un anticuerpo marcado de manera que puede detectarse o mediante detección de anticuerpo unido a través del ensayo tipo sándwich. En una realización, los marcadores detectables son marcadores de PET y SPECT orgánicos de pequeño tamaño, tales como  $^{18}\text{F}$ ,  $^{11}\text{C}$  o  $^{123}\text{I}$ . Debido a su pequeño tamaño, los marcadores de PET y SPECT orgánicos se adecuan de manera ideal para monitorear eventos intracelulares ya que no afectan en gran medida las propiedades del dispositivo de direccionamiento en general y su transporte de membrana en particular. Una sonda de formación de imágenes que comprende un marcador de PET y cualquiera de las fracciones activas de retro Diels-Alder como una fracción de direccionamiento secundaria es lipofílica y puede difundirse de manera pasiva hacia dentro y hacia afuera de las células hasta que encuentra su pareja de unión. Además, ambos componentes no impiden atravesar la barrera hematoencefálica y permiten, de este modo, la formación de imágenes de las regiones del cerebro.

Cuando la sonda efectora se dirige a comprender un marcador detectable basado en un metal, tal como un lantánido (por ejemplo, Gd) para mejorar el contraste en MRI, dicho metal se proporciona preferiblemente en la forma de un quelato. En un caso como tal, la sonda efectora comprende una fracción estructural que puede formar un complejo de coordinación con un metal como tal. Un buen ejemplo de esto son los quelatos de lantánidos (III) macrocíclicos que derivan de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético ( $\text{H}_4\text{dota}$ ) y ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano- $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\alpha''$ ,  $\alpha'''$ -tetrametil-1,4,7,10-tetraacético ( $\text{H}_4\text{dotma}$ ).

La fracción efectora puede ser, además, una fracción terapéutica tal como un compuesto farmacéuticamente activo. Ejemplos de compuestos farmacéuticamente activos se proporcionan en la presente. Una sonda terapéutica puede comprender además, de manera opcional, un marcador detectable.

De este modo, de acuerdo con otra realización, los kits de predirecciónamiento de la invención se usan para terapia dirigida. Esto se logra al hacer uso de una sonda efectora que comprende una fracción de direccionamiento secundaria y uno o más agentes farmacéuticamente activos (a saber, un fármaco o un isótopo radioactivo para terapia de radiación). Fármacos adecuados para uso en el contexto del suministro de fármacos dirigido se conocen en la técnica. De manera opcional, la sonda terapéutica puede comprender además un marcador detectable, tal como uno o más agentes de formación de imágenes. Un radionúclido que se usa para terapia puede ser un isótopo que se selecciona a partir del grupo que consiste en  $^{24}\text{Na}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{76}\text{As}$ ,  $^{77}\text{As}$ ,  $^{80}\text{Br}$ ,  $^{82}\text{Br}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{90}\text{Nb}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{103}\text{Ru}$ ,  $^{105}\text{Ph}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{121}\text{Sn}$ ,  $^{127}\text{Te}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{140}\text{La}$ ,  $^{141}\text{Ce}$ ,  $^{142}\text{Pr}$ ,  $^{143}\text{Pr}$ ,  $^{144}\text{Pr}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{149}\text{Tb}$ ,  $^{151}\text{Pm}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{169}\text{Er}$ ,  $^{172}\text{Tm}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{211}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{214}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ , y  $^{225}\text{Ac}$ .

De manera alternativa, el fármaco en la sonda terapéutica se selecciona a partir de sensibilizantes para terapia fotodinámica.

5 En la sonda efectora, la fracción de direccionamiento secundaria, a saber, el grupo reactivo bioortogonal secundario y la fracción efectora pueden ligarse directamente uno con respecto al otro. Pueden unirse además uno con respecto al otro mediante un ligador, y ambos pueden unirse, además, a un almacén de direccionamiento primario. El ligador puede seleccionarse, de manera independiente, a partir de las mismas fracciones, por ejemplo, polietilenglicoles, según se analiza anteriormente. El almacén de direccionamiento secundario puede ser, por ejemplo, un biopolímero tal como un polipéptido.

10 La invención se refiere, además, a un método de predireccionamiento, usando la reacción retro Diels-Alder. En la presente, una sonda de predireccionamiento que comprende una fracción de direccionamiento primaria (por ejemplo, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, o un péptido de unión a receptor), que se funcionaliza con un compuesto de acuerdo con la fórmula (7) que se menciona anteriormente, o con un ciclooctano de acuerdo con la fórmula (1) anterior, respectivamente, se inyecta en un sujeto. Después de la unión a la diana (por ejemplo, una lesión de tumor metastásico o primaria, una placa aterosclerótica, un área infartada, un sitio de infección o inflamación, etc.) y depuración de la circulación y de los tejidos no diana (por ejemplo, sangre, hígado, bazo, riñón, etc.), una sonda efectora que comprende una fracción de direccionamiento secundaria, por ejemplo, que transporta un E-ciclooctano o derivado de tetrazina, respectivamente (a saber, la contraparte reactiva del grupo reactivo bioortogonal que se presenta en la sonda de predireccionamiento), y un fármaco o un marcador que puede representarse en imágenes, se inyectan. La sonda efectora se une a la fracción de direccionamiento primaria y proporciona alto contraste o trata el sitio de enfermedad de manera selectiva.

25 La invención se relaciona además con el direccionamiento de una vía metabólica general, que se regula de manera positiva durante una enfermedad (como infección o cáncer) tal como síntesis de ADN, proteína, y membrana y absorción de carbohidratos. Las sondas adecuadas comprenden aminoácidos, azúcares, ácidos nucleicos y colina marcados con dienos y dienófilos, análogos a los rastreadores metabólicos que se usan actualmente en la técnica, [11C]-metionina, [18F]-fluorodesoxiglucosa (FDG), desoxi-[18F]-fluorotimidina (FLT) y [11C]-colina. Las células con un alto metabolismo o proliferación tienen una mayor absorción de estos componentes básicos. En este método, por ejemplo, los derivados de tetrazina o E-ciclooctano ingresan en estas u otras vías y se acumulan en y/o sobre células. Después de una acumulación y eliminación suficientes de la sonda libre, se envía una sonda de tetrazina o sonda de E-ciclooctano marcada de forma detectable o portadora de fármaco (permeable a las células) (o sondas que transportan otros dienos/dienófilos de acuerdo con la invención) para unir el E-ciclooctano acumulado, respectivamente metabolito de tetrazina. Como una ventaja en cuanto a la formación de imágenes con FDG (flúor-18 fluorodeoxiglucosa) normal, se dispone de un tiempo amplio para permitir acumulación alta de la fracción de direccionamiento antes de que se envíe radioactividad, aumentando, de este modo, la proporción de la diana con respecto a la no diana. De manera alternativa, una vía metabólica y/o metabolito que es específico para una enfermedad puede ser dirigida.

40 La invención se relaciona además al predireccionamiento de dianas intracelulares. Debido a su tamaño pequeño, los marcadores de PET orgánicos (18F, 11C) resultan adecuados de manera ideal para monitorear eventos intracelulares ya que no afectan en gran medida las propiedades del dispositivo de direccionamiento en general y su transporte de membrana en particular (al contrario de los conjugados de constructos radioquelato-metal grandes y polares). A pesar de que la fracción de tetrazina sustituida y el E-ciclooctano que se usan en la invención no son necesariamente pequeños, son relativamente no polares y pueden usarse para formación de imágenes intracelulares de proteínas, ARNm, vías de comunicación, etc. La sonda secundaria (marcada para PET) de fracción de tetrazina sustituida o de E-ciclooctano (a saber, la sonda efectora) puede difundirse de manera pasiva hacia adentro y hacia afuera de la célula hasta que encuentra su pareja de unión. Estas propiedades permiten, además, el uso de la reacción retro Diels-Alder para predireccionamiento en el cerebro ya que ambos componentes no impiden atravesar la barrera hematoencefálica.

50 La invención se relaciona también con la amplificación de señal dirigida y/o instalación de polivalencia. Al menos un dispositivo de direccionamiento primario se conjuga con un dendrímero o polímero que contiene múltiples fracciones de tetrazina. Después de unión al receptor, un (uno o más) ciclooctano o ciclooctano conjugado con una o más fracciones de contraste para formación de imágenes nuclear (por ejemplo, un quelato radiometálico, un radiohalógeno, etc.) o MRI (por ejemplo, quelatos de Gd) se inyecta. La reacción retro Diels-Alder posterior da como resultado una alta concentración de agente de contraste para MRI en el tejido diana. Además, la polivalencia en el sitio diana aumentará la cinética de reacción con el ciclooctano o conjugado efector de ciclooctano, permitiendo obtener una acumulación diana eficiente de por ejemplo agentes de contraste para MRI. De manera natural, el ciclooctano o ciclooctino pueden usarse en el conjugado de direccionamiento del dispositivo y en la tetrazina conjugada con el reportero (u otro dieno de la invención).

60 Ruta de conjugación y kits

65 La invención se relaciona además con el uso de la reacción retro Diels-Alder como una ruta para la conjugación de agentes de formación de imágenes y fármacos con constructos de direccionamiento tales como péptidos. El efector puede contener grupos prostéticos orgánicos marcados para PET, complejos metálicos para PET/SPECT/MRI y microburbujas para formación de imágenes por ultrasonidos, pero además, emisores  $\alpha$  y  $\beta$  para radioterapia y, de manera general, un agente citotóxico anticáncer. Los agentes de formación de imágenes/terapia pueden

funcionalizarse con una fracción de tetrazina colgante y el grupo de direccionamiento con un derivado de ciclooctano, o viceversa.

5 La presente ruta resulta especialmente ventajosa para agentes para formación de imágenes nuclear y radioterapia: en vista de la descomposición del radionúclido, resulta beneficioso conducir la etapa que consume mayor tiempo (el direccionamiento actual en el cuerpo de un sujeto) como una etapa de predireccionamiento. La selección, de acuerdo con la invención, de la química retro Diels-Alder muy rápida que se describe anteriormente para el direccionamiento secundario permite el uso de un amplio intervalo de radionúclidos, incluyendo los de vida más corta en comparación con los métodos existentes. Las sonda efectoras funcionalizadas con ciclooctano y dienos adecuados, por ejemplo, sonda de predireccionamiento que transportan tetrazina, pueden acoplarse a concentraciones extremadamente bajas *in vivo* sin la necesidad de circulación en sangre continua de la fracción efectora (tal como el radionúclido). Se deberá comprender que esto se mantiene por igual para las sondas de predireccionamiento que transportan ciclooctano en combinación con sondas efectoras funcionalizadas con dieno, en particular tetrazina. Además, los grupos reactivos son ventajosamente estables, y presentan, de este modo, una reactividad más prolongada sin ser demasiado proclives a las reacciones laterales.

Deberá comprenderse que lo anterior proporciona ventajas tales como minimizar la dosis de radiación al paciente. Además, permite el uso de agentes de PET, a saber, tomografía de emisión de positrones en lugar de agentes de SPECT, a saber, tomografía computarizada de emisión monofotónica.

La presente invención resulta particularmente adecuada para uso en formación de imágenes multimodal, usando, de manera opcional, diferentes agentes formadores de imágenes para visualizar la misma diana. De manera alternativa, la sonda de formación de imágenes comprende al menos 2 marcadores diferentes para permitir la formación de imágenes multimodal.

La aplicación de la química retro Diels-Alder de tipo [4+2] en la formación de imágenes moleculares facilita el predireccionamiento a todos los tipos y tamaños de constructos de direccionamiento. Esto permite la formación de imágenes intracelulares y metabólicas para sacar provecho de la alta acumulación diana y bajo fondo, que se consigue a través de la acumulación de predireccionamiento. Asimismo, los esquemas de amplificación de señal predirigidos, por ejemplo, politetrazina y/o dendrímeros de polialqueno o liposomas, se vuelven disponibles para dispositivos de direccionamiento más pequeños y más diversos.

Como las parejas de reacción son abióticas y bioortogonales, el predireccionamiento que usa la reacción retro Diels-Alder de tipo [4+2] según se describe anteriormente, no se encuentra obstaculizada por la competencia endógena y metabolismo/descomposición, y permite obtener un enlace covalente estable. Al elegir una vía metabólica diana, y el derivado de tetrazina-metabolito correspondiente en virtud de su alto flujo en, por ejemplo, células tumorales en comparación con células normales, se puede obtener la instalación de una alta densidad de receptores de tetrazina artificiales u otros manejos químicos en células o en las superficies de células diana, evitando el uso de receptores de superficie celular endógenos que pueden encontrarse algunas veces a niveles bajos.

Realizaciones particulares adicionales de la presente invención se refieren a kits que comprenden un precursor metabólico y una sonda de formación de imágenes, más particularmente una sonda de formación de imágenes que comprende un marcador detectable, que es una agente de contraste que se usa en sistemas de formación de imágenes tradicionales. Un marcador detectable como tal puede ser, pero sin limitación, un marcador que se selecciona a partir del grupo que consiste en constructos que pueden representarse en MRI, marcador espín, marcadores ópticos, agentes de respuesta a ultrasonidos, agentes de respuesta a rayos X, radionúclidos, y colorantes de tipo FRET. En una realización en particular de la presente invención, se hace uso de sondas reporteras. Una sonda reportera como tal puede ser el sustrato de una enzima, más particularmente una enzima que no es endógena con respecto a la célula, pero que se ha introducido por medio de terapia de genes o infección con un agente foráneo. No endógeno con referencia a un gen en una célula o tejido en la presente se usa para indicar que el gen no se presenta y/o expresa de manera natural en esa célula o tejido. De manera alternativa, una sonda reportera como tal es una molécula que se introduce en la célula por medio de un receptor o una bomba, que puede ser endógena o introducirse en la célula por medio de terapia de genes o infección con un agente foráneo. De manera alternativa, la sonda reportera es una molécula que reacciona frente a determinadas condiciones (cambiando) en un ambiente celular o tisular.

La invención incluye además agentes para uso en los kits que se describen anteriormente. Un agente como tal es un agente de predireccionamiento que comprende una fracción de direccionamiento primaria y un grupo reactivo bioortogonal, en el que el grupo reactivo bioortogonal es una pareja de reacción para una reacción retro Diels-Alder de tipo [4+2]. Las parejas de reacción particulares se describen en la presente a continuación, a saber, una tetrazina deficiente de electrones según se analiza anteriormente, o un ciclooctano (preferiblemente, un E-ciclooctano). La invención se refiere además al uso de estos agentes en formación de imágenes médicas dirigida o terapia dirigida, y a estos agentes para uso en un método como tal. En particular, la invención se refiere a este uso de estos agentes en un método de predireccionamiento, y a estos agentes para uso en un método como tal. Otro agente como tal es una sonda de formación de imágenes que comprende un marcador detectable y un grupo reactivo bioortogonal, en el que el grupo reactivo bioortogonal es una pareja de reacción para una reacción retro Diels-Alder de tipo [4+2].

La invención se refiere además a una sonda de formación de imágenes que comprende un marcador detectable y un grupo reactivo bioortogonal, en el que el grupo reactivo bioortogonal es una pareja de reacción para una reacción retro Diels-Alder de tipo [4+2]. La invención se refiere además a una sonda terapéutica que comprende un compuesto farmacéuticamente activo y un grupo reactivo bioortogonal, en el que el grupo reactivo bioortogonal es una pareja de reacción para una reacción retro Diels-Alder de tipo [4+2].

Parte de la invención se refiere además a un método de predireccionamiento que comprende administrar un agente de predireccionamiento según se describe anteriormente a un sujeto y permitir que el agente circule en el sistema del sujeto durante un período de tiempo efectivo para alcanzar la unión de la fracción de direccionamiento primaria con la diana primaria, continuando con la depuración del agente no unido del cuerpo. Un período de tiempo normal para esto es de 12 a 96 horas, en particular aproximadamente 48 horas.

Además, la invención proporciona un método de formación de imágenes que comprende conducir un método de predireccionamiento según se describe anteriormente, continuando con la administración de una sonda de formación de imágenes de acuerdo también con la invención, en el que los grupos reactivos bioortogonales en el agente de predireccionamiento y en la sonda de formación de imágenes forman en conjunto las parejas reactivas para la reacción retro Diels-Alder de tipo [4+2]. De manera similar, la invención proporciona un método de tratamiento médico dirigido en un sujeto, que comprende conducir un método predirigido según se describe anteriormente, continuando con la administración de una sonda terapéutica de acuerdo también con la invención, en el que los grupos reactivos bioortogonales en el agente de predireccionamiento y en la sonda de formación de imágenes forman en conjunto las parejas reactivas para la retro Diels-Alder de tipo [4+2].

La invención se relaciona además con los agentes de predireccionamiento que se mencionan anteriormente para uso en un método de formación de imágenes según se describe anteriormente.

En resumen, sobre la base de la química retro Diels-Alder, la formación de imágenes moleculares bioortogonales predirigida y la terapia sirven para proporcionar grandes ventajas a pacientes. Por un lado, esto sirve para poder adquirir imágenes superiores de tejidos diana tales como lesiones cancerosas y cardiovasculares. Por el otro lado, los efectos laterales intrínsecos que derivan a partir de la administración de compuestos radioactivos y, de manera general, los fármacos potencialmente tóxicos pueden reducirse en gran medida mientras que se aumenta la dosis efectiva que alcanza un tejido enfermo. Además, se expandirá ampliamente el conjunto de eventos moleculares que se pueden rastrear que subyace la enfermedad. En particular, esta tecnología puede otorgar acceso a tejidos diana que se encuentran alejados de los vasos sanguíneos y facilitarán la formación de imágenes del medio intracelular rico en información.

La invención se ilustrará con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes y las figuras adjuntas no limitantes.

#### Ejemplo 1

Como un ejemplo para ligar la fracción que deriva de tetrazina a un anticuerpo según se representa en la Fig. 3a, se prepara una molécula 1 (véase Fig. 4). Un ejemplo de una sonda 2 correspondiente, que deriva de E-ciclooctano, se presenta en la Fig. 5. Ambas moléculas contienen cadenas de PEG. La molécula 1 comprende una fracción de N-hidroxisuccimidil, que se usa para acoplar la molécula con grupos amino que se presentan en el anticuerpo. La fracción derivada de DOTA en 2 puede usarse para transportar un ion metálico térreo raro tal como Gd para formación de imágenes por MR o Lu-177 para formación de imágenes nuclear y terapia (SPECT).

La síntesis de 1 se indica en la Fig. 4. La molécula 5 de partida que deriva de tetrazina se confecciona de acuerdo con Blackman et al. (Blackman, ML; Royzen, M; Fox, JM, Journal of The American Chemical Society, 2008, 130 (41), 13518-19). Se convierte en el ácido 6 mediante la reacción con anhídrido succínico continuando con la formación de éster 7 de N-hidroxisuccimidil. Este éster de N-hidroxisuccimidil se usa para formar ácido 9 mediante la reacción con derivado 8 de PEG que se dispone comercialmente (IRIS Biochem) que, a su vez, se convierte en su éster 1 de N-hidroxisuccimidil.

La síntesis de 2 se indica en la Fig. 5. (E)-cyclooct-4-enol (10) se prepara de acuerdo con Yap et al. (Yap, GPA; Royzen, M; Fox, JM, Journal of The American Chemical Society, 2008, 130 (12), 3760-61). Con la ayuda del derivado 11 de isocianato que se dispone comercialmente (Aldrich), este se convierte en éster 12, continuando con la saponificación a ácido 13. El éster 14 de N-hidroxisuccimidil que se forma de 13 se confecciona para reaccionar con el DOTA y la amina 18 que deriva de PEG para formar el producto 2 final. El derivado 18 de DOTA se prepara después de la desprotección del 17 que se prepara, a su vez, a partir del derivado 15 de DOTA y derivado 16 de PEG, ambos disponibles comercialmente (de Macrocyclics e IRIS biotech, respectivamente.)

#### Ejemplo 2

En comparación con el Ejemplo 1, este ejemplo ilustra el par inverso de moléculas, a saber, 1) el derivado 3 de E-ciclooctano dirigido a formar la fracción de predireccionamiento después de conjugarse con el anticuerpo y, 2) la sonda

4 derivada de tetrazina/DOXA puede servir como la sonda efectora según se indica en la Fig. 3b, se muestra en las Figs. 6 y 7, respectivamente.

5 El derivado 3 de E-ciclooctano se forma mediante la reacción del derivado 8 de PEG que se dispone comercialmente (IRIS biochem) con éster 14 de N-hidroxisuccimidil (véase Fig. 5) para formar ácido 19, continuando con la formación del derivado de N-hidroxisuccimidil de este ácido.

10 La síntesis de la sonda 4 derivada de tetrazina/DOXA se indica en la Fig. 7. Esta sonda se realiza mediante la reacción de la amina 18 que deriva de DOXA y PEG (véase Fig. 5) con éster 7 de N-hidroxisuccimidil (véase Fig. 4).

### Ejemplo 3: formación de imágenes *in vivo*

15 Todos los reactivos y solventes se obtuvieron de fuentes comerciales (Sigma-Aldrich, Acros, ABCR, Invitrogen, y Merck para reactivos, Biosolve, Merck y Cambridge Isotope Laboratories para solventes normales y deuterados) y se usaron sin purificación adicional a menos que se indique lo contrario. Ácido 1-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-dodecaoxanonatriacontan-39-oico (S11) y terc-butilo (35-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-undecaioxapentatriacontil) carbamato (S3) se obtuvieron de Polypure (Noruega) e Iris Biotech (Alemania), respectivamente. El ácido 2,2',2''-(10-(2-((2,5-Dioxopirrolidin-1-il)oxi)-2-oxoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triil) triacético (S6) como una sal con HPF<sub>6</sub> y aproximadamente 3 eq. de ácido trifluoroacético (TFA) se obtuvieron de Macrocyclics (EE.UU.). Soluciones de rituximab (MabThera®) fueron adquiridas de Roche (Suiza). Se adquirieron soluciones de cloruro de indio [<sup>111</sup>In] y yoduro [<sup>125</sup>I] de sodio de PerkinElmer (EE.UU.). El agua se destiló y desionizó (18 mΩcm<sup>-1</sup>) por medio de un sistema de filtración de agua milli-Q (Millipore, EE.UU.). Los reguladores de marcaje se trataron con resina Chelex-100 (BioRad Laboratories, EE.UU.) durante la noche, luego se filtraron a través de 0,22 μm y se almacenaron a 4 °C. Tubos de yodación de yodogen, kits para análisis de ácido bicinonínico (BCA) y soluciones de tinción de proteínas azul seguro gelcode se adquirieron de Pierce Protein Research (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Tabletas para preparar solución salina regulada con fosfato (PBS), pH 7,4, se adquirió de Calbiochem (Merck, Alemania). Las unidades de filtro para centrifugado Amicon Ultra-4 y Ultra-15 (corte de 50 kDa MW) se adquirieron de Millipore. Se adquirió suero de ratón de Innovative Research (EE.UU.).

30 Los espectros de RMN se registraron en cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>) o dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO-d<sub>6</sub>), utilizando un espectrómetro Bruker DPX300 o un espectrómetro Bruker Avance600 (Bruker BioSpin, Países Bajos). Las multiplicidades de <sup>13</sup>C-RMN (q= cuaternario, t= terciario, s= secundaria y p= primaria) se distinguieron usando una secuencia de pulso DEPT. Los espectros de masas ESI de alta resolución (HRMS) se registraron en un espectrómetro de masas ESI-TOF de Agilent (Agilent Technologies, EE.UU.), que mide en el modo de iones positivos. La cromatografía preparativa en columna se realizó en un aparato Combiflash Companion (Teledyne Isco, EE.UU.) usando columnas de sílice (SiliCycle, Canadá). La HPLC preparativa se realizó utilizando un aparato Agilent 1200, equipado con una columna Zorbax C18 (21,2X150 mm, partículas de 5 μm) aplicando un gradiente de agua y acetonitrilo (ACN) que contiene TFA al 0,1%. La radio-HPLC analítica se realizó en un sistema Agilent 1100 equipado con un detector radiactivo Gabi (Raytest, Alemania). Las muestras se cargaron en una columna Agilent Eclipse XDB-C18 (4,6X150 mm, partículas de 5 μm), que se eluyó a 1 ml/min con un gradiente lineal de ACN en agua que contiene TFA al 0,1% (2 minutos a ACN al 10% continuando con un aumento a ACN al 45% en 11 minutos). La longitud de onda UV se preestableció a 254 nm. La HPLC de exclusión por tamaño (SEC) se llevó a cabo en un sistema Agilent 1200 equipado con un detector radiactivo Gabi. Las muestras se cargaron en una columna BioSep-SEC-S 2000 (300X7,8 mm, partículas de 5 μm, Phenomenex, EE.UU.) y se eluyeron con fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,8, a 1 ml/min. La longitud de onda UV se preestableció a 260 y 280 nm.

50 Los rendimientos de marcaje con <sup>111</sup>In se determinaron por radio-TLC, usando bandas ITLC-SG (Pall, EE.UU.) que se eluyeron con ácido etilendiaminotetraacético 200 mM en NaCl ac. al 0,9% y se representaron en imágenes en un generador de imágenes de fósforo (FLA-7000, Fujifilm, Japón). En estas condiciones, <sup>111</sup>In libre migra con R<sub>f</sub>= 0,9, mientras que <sup>111</sup>In-tetrazina permanece en el origen. Los rendimientos de marcaje <sup>125</sup>I se determinaron también con radio-TLC, usando bandas de ITLC-SG que se eluyeron con una solución de ácido cítrico 20 mM (pH 5,2) y se representaron en imágenes en un generador de imágenes de fósforo. En estas condiciones, el <sup>125</sup>I libre migra con R<sub>f</sub>= 0,9, mientras que los <sup>125</sup>I-mAbs permanecen en el origen.

55 El análisis de enfoque isoeléctrico (IEF) y SDS-PAGE se realizaron en un sistema Phastgel usando geles IEF-3-9 y geles homogéneos de PAGE al 7,5% (GE Healthcare Life Sciences, EE.UU.), respectivamente. La solución de calibración IEF (IP amplio, pH 3-10) se adquirió de GE Healthcare y la solución estándar de proteína MW (Precision Plus dual color estándar) se adquirió de BioRad. Tras la electroforesis, los geles se tiñeron durante 2 h con azul seguro gelcode, se decoloraron durante la noche en agua y se digitalizaron luego con un escáner de cama plana convencional.

60 La concentración de las soluciones de CC49 y rituximab se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (absorbancia a 280 nm; Thermo Fisher Scientific, Países Bajos) o con una prueba de BCA.

65 Síntesis de tetrazina DOXA (S7)

El resumen de la síntesis de ácido 2,2',2''-(10-(2,40,44-trioxa-44-((6-(6-(piridin-2-il)-1,2,4,5-tetrazin-3-il)piridin-3-il)amino)-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-undecaoxa-3,39-diazatetracontil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triilo) triacético (S7) se muestra en la figura 8.

5 Ácido 5-oxo-5-(6-(6-(piridin-2-il)-1,2,4,5-tetrazin-3-il)piridin-3-ilamino) pentanoico (S2).

Se sintetizó 6-(6-(piridin-2-il)-1,2,4,5-tetrazin-3-il)piridin-3-amina (S1) de acuerdo con un procedimiento de la literatura (M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, J. Am. Chem. Soc. 130, 13518 (2008)). Una mezcla de S1 (103 mg, 0,410 mmol) y anhídrido glutárico (234 mg, 2,05 mmol) en tetrahidrofurano (12 ml) se calentó a 70 °C durante 18 h en un matraz sellado. Después de enfriar, el precipitado se lavó con diclorometano (DCM) (2X12 ml) y acetato de etilo (12 ml) para rendir S2 como un sólido púrpura (62 mg, 42%). <sup>1</sup>H RMN (DMSO-D<sub>6</sub>, 300 MHz, δ): 12,13 (s, 1H), 10,58 (s, 1H), 9,05 (d, J = 2,3 Hz, 1H), 8,94 (d, J = 4,2 Hz, 1H), 8,62 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 8,60 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 8,43 (dd, J<sub>1</sub> = 2,3 Hz, J<sub>2</sub> = 8,8 Hz, 1H), 8,16 (td, J<sub>1</sub> = 7,8 Hz, J<sub>2</sub> = 1,7 Hz, 1H), 7,73 (ddd, J<sub>1</sub> = 1,1 Hz, J<sub>2</sub> = 4,4 Hz, J<sub>3</sub> = 7,4 Hz), 2,50 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 2,33 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 1,86 (q, J = 7,3 Hz, 2H). <sup>13</sup>C RMN (DMSO-D<sub>6</sub>, 75 MHz, δ): 174,1 (q), 172,0 (q), 163,0 (q), 162,7 (q), 150,6 (t), 150,2 (q), 143,8 (q), 141,3 (t), 138,4 (q), 137,7 (t), 126,5 (t), 126,1 (t), 124,8 (t), 124,1 (t), 35,4 (s), 32,9 (s), 20,2 (s). HRMS (ESI, m/z): se calculó para C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>7</sub>O<sup>+</sup> ([M+H]<sup>+</sup>): 366,1314; se encontró: 366,1313.

20 Terc-butilo (37,41-dioxa-41-((6-(6-(piridin-2-il)-1,2,4,5-tetrazin-3-il)piridin-3-il) amino)-3,6,9,12,15,18, 21,24,27,30,33-undecaoxa-36-azahentetracontil)carbamato (S4).

Se añadió N,N-diisopropiletilamina (95 µl, 0,41 mmol) a una mezcla agitada de S2 (15 mg, 0,041 mmol), S3 (29 mg, 0,045 mmol) y hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio (19 mg, 0,043 mmol) en dimetilformamida (DMF) (1 ml). Después de agitar durante 16 h a temperatura ambiente (RT), la mezcla se evaporó y el producto se purificó por cromatografía en columna sobre sílice usando un gradiente de metanol en DCM (0-10%) proporcionando S4 como un sólido púrpura (30 mg, 74%). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, δ): 9,07 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 8,97 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 8,73 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 8,72 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 8,63 (dd, J<sub>1</sub> = 2,3 Hz, J<sub>2</sub> = 8,8 Hz, 1H), 8,03 (td, J<sub>1</sub> = 7,8 Hz, J<sub>2</sub> = 1,7 Hz, 1H), 7,59 (ddd, J<sub>1</sub> = 1,1 Hz, J<sub>2</sub> = 4,6 Hz, J<sub>3</sub> = 7,4 Hz), 7,01 (s, 1H), 5,14 (s, 1H), 3,9-3,2 (ancho s, 48H), 2,60 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 2,37 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 2,09 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 1,43 (s, 9H). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz, δ): 173,8 (q), 173,1 (q), 163,8 (q), 163,7 (q), 151,3 (t), 150,5 (q), 144,0 (q), 142,7 (t), 139,2 (q), 137,9 (t), 127,0 (t), 126,9 (t), 125,5 (t), 124,7 (t), 79,5 (q), 70,5 (s), 70,1 (s), 40,7 (s), 39,7 (s), 36,5 (s), 35,5 (s), 28,8 (p), 21,9 (s). HRMS (ESI, m/z): se calculó para C<sub>46</sub>H<sub>74</sub>N<sub>9</sub>O<sub>15</sub><sup>+</sup> ([M+H]<sup>+</sup>): 992,5304; se encontró: 992,5301.

35 Ácido 2,2',2''-(10-(2,40,44-trioxa-44-((6-(6-(piridin-2-il)-1,2,4,5-tetrazin-3-il)piridin-3-il)amino)-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-undecaoxa-3,39-diazatetracontil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-triilo) triacético (S7).

El producto S4 (30 mg, 0,030 mmol) se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente en una mezcla de TFA (1,5 ml) y DCM (5 ml). Después de la evaporación, el residuo (principalmente S5) se disolvió en DMF (5 ml), se agregaron S6 (27 mg, 0,028 mmol) y trietilamina (40 µL, 0,27 mmol) y la mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Después de la evaporación, el material crudo se disolvió en DMSO y se purificó mediante HPLC preparativa. Después de la liofilización, se obtuvo S7 (24 mg, 69%) como una sal de TFA púrpura, según se confirma por el análisis <sup>13</sup>C-RMN (δ = 158,7ppm, q, J = 32,3Hz y δ = 117,6ppm, q, J = 298,2Hz). <sup>1</sup>H RMN (DMSO-D<sub>6</sub>, 600 MHz, δ): 9,22 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 9,10 (dd, J<sub>1</sub> = 4,7 Hz, J<sub>2</sub> = 1,1 Hz, 1H), 8,78 (d, J = 8,7 Hz, 1H), 8,75 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 8,59 (dd, J<sub>1</sub> = 2,4 Hz, J<sub>2</sub> = 8,7 Hz, 1H), 8,32 (td, J<sub>1</sub> = 7,8 Hz, J<sub>2</sub> = 1,7 Hz, 1H), 8,08 (ddd, J<sub>1</sub> = 1,1 Hz, J<sub>2</sub> = 4,7 Hz, J<sub>3</sub> = 7,8 Hz), 3,9-3,1 (m, 80H), 2,60 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 2,34 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 2,02 (q, J = 7,3 Hz, 2H). <sup>13</sup>C RMN (DMSO-D<sub>6</sub>, 150 MHz, δ): 172,8 (q), 172,5 (q), 163,8 (q), 163,5 (q), 151,3 (t), 150,9 (q), 144,5 (q), 142,0 (t) 139,3 (q), 138,5 (t), 127,3 (t), 126,9 (t), 125,6 (t), 124,9 (t), 70,5 (s), 70,3 (s), 69,9 (s), 69,5 (s), 39,2 (s), 36,4 (s), 35,2 (s), 21,7 (s). HRMS (ESI, m/z): se calculó para C<sub>57</sub>H<sub>92</sub>N<sub>13</sub>O<sub>20</sub><sup>+</sup> ([M+H]<sup>+</sup>): 1278,6582; se encontró: 1278,6557.

Síntesis de TCO-NHS, S13

55 La síntesis de (E)-2,5-dioxopirrolidin-1-ilo 1-(4-((ciclooct-4-en-1-iloxi)metil)fenil)-1-oxo-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-dodecaoxa-2-azahentetracontan-41-oato (S13) se muestra en la figura 9.

(E)-2,5-Dioxopirrolidin-1-il 4-((ciclooct-4-eniloxi) metil) benzoato (S10).

60 Se sintetizó (E)-ciclooct-4-enol (S8, isómero principal que contiene aproximadamente el 13% del isómero Z) de acuerdo con un procedimiento de la literatura (M. Royzen, G. P. A. Yap, J. M. Fox, J. Am. Chem. Soc. 130, 3760 (2008)). Se añadió dispersión de hidruro de sodio al 60% (1,8 g, 45 mmol) a una solución que se enfrió en baño de hielo de S8 (1,70 g, 13,5 mmol) en 60 ml de DMF. Después de agitar durante 4 h a temperatura ambiente, se añadió ácido 4-bromometilbenzoico (3,85 g, 17,9 mmol) en porciones y la suspensión se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla se vertió en agua (100 ml), se añadió t-butil metil éter (100 ml) continuando con ácido clorhídrico al 37% (5 ml). Después de la separación, la capa acuosa se extrajo con t-butil metil éter (2X100 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (25 ml), se separaron en MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron. El residuo se pasó a través de una capa delgada de sílice con hexano/acetato de etilo 4:1. El residuo obtenido después de la evaporación

se disolvió en heptano (50 ml) a 70 °C y luego se enfrió, proporcionando S9. El producto se disolvió en DCM (40 ml), se añadió N-hidroxisuccinimida (0,57 g, 4,9 mmol), la mezcla se enfrió en un baño de hielo, continuando con la adición de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (1,03 g, 4,99 mmol). Después de 30 minutos, el baño de hielo se retiró y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. Después de filtración y evaporación, el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre sílice usando un gradiente de acetato de etilo en heptano (0-15%). A continuación, el residuo se disolvió en t-butil metil éter (20 ml) y se vertió en heptano (50 ml), produciendo S10 (1,42 g, 29%) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, δ): 8,10 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,45 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 5,60 (m, 1H), 5,34 (m, 1H), 4,54 (d, J = 13,4 Hz, 1H), 4,47 (d, J = 13,4 Hz, 1H), 3,09 (m, 1H), 2,91 (s, 4H), 2,43-1,40 (m, 10H). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz, δ): 169,0 (q), 161,5 (q), 146,7 (q), 135,1 (t), 132,1 (t), 130,4 (t), 127,0 (t), 123,7 (q), 85,3 (t), 68,0 (s), 40,5 (s), 37,7 (s), 34,2 (s), 32,7 (s), 31,4 (s), 25,4 (s). HRMS (ESI, m/z): se calculó para C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub>Na<sup>+</sup> ([M+Na]<sup>+</sup>): 380,1474; se encontró: 380,1472.

(E)-2,5-dioxopirrolidin-1-ilo 1-(4-((ciclooct-4-en-1-iloxi)metil)fenil)-1-oxo-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-dodecaoxa-2-azahentetracontan-41-oato (S13)

Se añadió gota a gota una solución de S10 (100 mg, 0,280 mmol) en DCM (2 ml) a una solución de S11 (175 mg, 0,283 mmol) y trietilamina (290 µl, 2,08 mmol) en DCM (2 ml) agitados en un baño de hielo. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El producto S12 intermedio crudo que se obtuvo después de la evaporación se disolvió en DCM (5 ml) y se enfrió en un baño de hielo. Se agregaron bis(2,5-dioxopirrolidin-1-il) carbonato (170 mg, 0,664 mmol) y piridina (28 µL, 0,35 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla se filtró y se evaporó y el producto se purificó mediante cromatografía en columna sobre sílice usando un gradiente de metanol en DCM (5-10%) permitiendo obtener S13 como un aceite viscoso (119 mg, 39%). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz, δ): 7,79 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,36 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,00 (s, 1H), 5,59 (m, 1H), 5,33 (m, 1H), 4,49 (d, J = 12,5 Hz, 1H), 4,42 (d, J = 12,5 Hz, 1H), 3,85 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 3,8-3,5 (m, 48H), 3,09 (m, 1H), 2,90 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,85 (s, 4H), 2,43-1,40 (m, 10H). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz, δ): 167,0 (q), 165,4 (q), 164,8 (q), 140,8 (q), 133,5 (t), 131,7 (q), 130,4 (t), 125,3 (t), 83,4 (t), 68,7 (s), 68,4 (s), 68,0 (s), 67,6 (s), 68,4 (s), 63,9 (s), 38,9 (s), 37,9 (s), 36,1 (s), 32,6 (s), 31,1 (s), 30,3 (s), 29,8 (s), 23,7 (s). HRMS (ESI, m/z): se calculó para C<sub>47</sub>H<sub>76</sub>N<sub>2</sub>O<sub>18</sub>Na<sup>+</sup> ([M+Na]<sup>+</sup>): 957,5171; se encontró: 957,5174.

#### Producción de anticuerpos

CC49 se produjo a partir de la línea celular de hibridoma CC49 adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC, EE.UU.). Las células de hibridoma se cultivaron en un biorreactor CELLLine CL 1000 (Integra Biosciences AG, Suiza) en medio de hibridoma sin suero (H-SFM, Gibco, EE.UU.) que se complementó con penicilina (10U/ml) y estreptomycin (10 µg/ml). Cada dos semanas se recolectó el sobrenadante celular y el CC49 se purificó mediante cromatografía de afinidad con proteína G usando un kit MabTrap (GE Healthcare Biosciences, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El CC49 purificado se lavó con PBS usando una unidad centrífuga Amicon Ultra-15. Este procedimiento proporcionó una solución de CC49 que contenía una especie única de aproximadamente 150 kDa, según se confirma mediante SDS-PAGE y análisis SEC-HPLC.

#### Modificación de anticuerpos

Normalmente, 2 mg de CC49 (solución de 5 mg/ml en PBS) se modificó con 10 equiv. molares de TCO-NHS (S13, 127,6 µg en 12,8 µl de DMSO) en un volumen total de 500 µl de PBS. El pH se ajustó a 9 con regulador de carbonato de sodio 2M. Las reacciones se llevaron a cabo bajo agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Posteriormente, el mAb modificado con TCO se lavó ampliamente con PBS usando un dispositivo centrífugo Amicon Ultra-15. Este procedimiento proporcionó un promedio de 7,4 grupos de TCO por anticuerpo, según se determina con una titulación de tetrazina (véase a continuación). El aumento de MW que resulta de la conjugación de TCO no se detectó mediante SDS-PAGE. Según se esperaba, la modificación de mAb dio como resultado una disminución de un punto isoelectrónico (de 6,5-6,8 a aproximadamente 5,8) según se observa por el análisis IEF. Se usó el mismo procedimiento para producir rituximab de TCO modificado (Rtx-TCO) para el control de experimentos *in vivo*, con resultados similares.

#### Anticuerpo radiomarcado

El CC49 nativo o modificado con TCO (200 µg) en PBS (500 µl) se transfirió a un tubo de yodación, que se enjuagó previamente con 1 ml de PBS. Se añadió yoduro [<sup>125</sup>I] de sodio (10-15 MBq), la solución se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente bajo agitación suave después de lo cual se transfirió a una unidad Amicon Ultra-4. El tubo de yodación se enjuagó dos veces con 500 µl de PBS y los lavados se combinaron con la mezcla de marcaje. El mAb marcado con <sup>125</sup>I se lavó ampliamente con PBS y posteriormente se recuperó del Amicon. Con este procedimiento, el rendimiento de radioyodación 88,3±9,3 (n= 5) se obtuvo para CC49 nativo y 30,4±4,3% (n= 6) para CC49 modificado con TCO. Después de la purificación de Amicon, la pureza radioquímica de ambos mAbs radiomarcados fue superior al 98% según se confirma mediante el análisis de radio-TLC y SDS-PAGE. El mismo procedimiento se usó para radioyodar Rtx-TCO para control de experimentos *in vivo*, con resultados similares. Para experimentos con animales, la actividad específica (SA) de los mAbs purificados marcados con <sup>125</sup>I se ajustó a 2 kBq/µg añadiendo una cantidad apropiada del correspondiente mAb sin marcar.

## Radiomarcaje de tetrazina

5 La tetrazina modificada por DOTA (sonda S7) se disolvió (1 mg/ml) en acetato de amonio 0,2 M pH 7,0 y se almacenó a -80 °C antes de su uso. Una alícuota de S7 se combinó con una cantidad adecuada de cloruro de indio [<sup>111</sup>In] y se incubó durante 10 min a 37 °C bajo agitación suave. Luego, se añadieron 5 µl de ácido dietilentriaminopentaacético 10 mM y la solución se incubó durante 5 minutos adicionales. Normalmente, se obtuvieron un rendimiento de marcación cuantitativo y una pureza radioquímica mayor que 98% con este método, según se confirma mediante radio-HPLC y radio-TLC. Para experimentos con animales, la solución de <sup>111</sup>In-tetrazina se diluyó con solución salina estéril. El SA de la solución de <sup>111</sup>In-tetrazina que se usó para experimentos *in vitro* y para estudios de biodistribución fue normalmente 50-100 kBq/µg de S7; la SA para los experimentos de formación de imágenes fue de 1-2 MBq/µg de S7.

Reactividad *in vitro*

15 La reactividad de <sup>111</sup>In-tetrazina hacia CC49-TCO se evaluó en PBS (n= 3), 50% de suero de ratón (n= 3) y sangre de rata con heparina. Normalmente, se incubaron 50 µg de mAb modificado con TCO con 0,43, 4,30 y 6,40 µg de S7 marcado con <sup>111</sup>In (1, 10 y 15 eq. molares con respecto al mAb) a 37 °C en un volumen total de 100 µl. Mezclas de CC49 sin modificar y 15 eq. de S7 marcados con <sup>111</sup>In se usaron para evaluar la unión no específica. Después de 10 minutos, se analizó una alícuota de cada mezcla mediante SDS-PAGE y generador de imágenes de fósforo. Se observó una reacción rápida entre ambos componentes *in vitro* en condiciones semiequimolares y a baja concentración (3,3 µM) en 10 min en PBS, suero y sangre. Se usó el mismo procedimiento para evaluar la reactividad de <sup>111</sup>In-tetrazina hacia Rx-TCO. La reacción entre <sup>111</sup>In-tetrazina y CC49-TCO en la totalidad de los tres medios se completó en 10 minutos (Tabla 1).

25 No se detectó una unión apreciable entre la tetrazina marcada y el CC49 no modificado u otros componentes del medio, lo que demuestra la ausencia de interacciones no específicas.

30 Tabla 1: Rendimientos de reacción (%) entre <sup>111</sup>In-tetrazina (eq. con respecto a mAb) y CC49-TCO después de 10 min de incubación (paréntesis: # sondas de tetrazina unidas por mAb)

	PBS	Suero	Sangre
1 eq.	86,5±1,3 (0,9±0,0)	88,3±1,8 (0,9±0,0)	87,0 (0,9)
10 eq.	74,7±6,9 (7,5±0,7)	72,0±1,3 (7,2±0,1)	72,6 (7,3)
15 eq.	50,0±1,5 (7,5±0,2)	48,5±0,4 (7,3±0,1)	50,0 (7,5)
Control (15 eq.)	0,3±0,3	0,2±0,2	0,0

Estudios *in vivo*

35 Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con los principios del cuidado de animales de laboratorio (publicación de NIH 85-23, revisado en 1985) y la ley nacional holandesa "Wet op de Dierproeven" (Stb 1985, 336). La línea celular LS174T de cáncer de colon humano se obtuvo del ATCC y se mantuvo en el medio esencial mínimo de Eagle (Sigma) que se complementó con suero fetal bovino inactivado por calor al 10% (Gibco), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y Glutamax 2 mm. Se inocularon subcutáneamente ratones nude Balb/C hembra (20-25 g de peso corporal, Charles River Laboratories, Países Bajos) con 5X10<sup>6</sup> células en 100 µl de PBS estéril. El peso del tumor en el momento de la formación de imágenes y los experimentos de biodistribución fue de 0,38±0,28 g. Los animales con diferentes tamaños de tumor se asignaron aleatoriamente a diferentes grupos experimentales.

45 Los ratones portadores de tumor (n= 4) se inyectaron por vía intravenosa con <sup>125</sup>I-CC49 o <sup>125</sup>I-CC49-TCO (100 µg/100 µl por ratón, aproximadamente 0,2 MBq). En puntos de tiempo seleccionados (5 min, 3 y 6 h, 1, 2 y 3 días) se extrajeron muestras de sangre de la vena safena. Cuatro días después de la inyección, los ratones se anestesiaron con isoflurano y se les extrajo sangre por punción cardíaca. Las muestras de sangre se pesaron y se diluyeron a 1 ml con PBS. La muestra de radioactividad se midió en un contador y (Wizard 1480, PerkinElmer) junto con estándares para determinar el porcentaje de dosis inyectada por gramo (% de ID/g). La vida media de los mAbs radiomarcados en sangre se calculó a partir del área bajo las curvas (AUC, GraphPad Prism v. 5.01) en la Fig. 10 usando  $T_{1/2} = \ln 2 \times AUC / C_0$ . En este estudio, el CC49 modificado con TCO exhibió una vida media en sangre más corta (11,0 h) en comparación con la del mAb sin modificar (19,8 h). Esto se atribuye al cambio de punto isoeléctrico que se origina por la funcionalización de 7,4 residuos de Lys por mAb. Para estudiar todo el potencial de este sistema, se seleccionó un intervalo relativamente corto de 24 h entre mAb y la administración de la sonda.

55 Experimentos de biodistribución

Los experimentos de biodistribución de doble isótopo se realizaron inyectando ratones portadores de tumor (n= 3) por vía intravenosa con mAbs marcados con  $^{125}\text{I}$  (CC49-TCO, CC49 o Rtx-TCO, 100  $\mu\text{g}/100\ \mu\text{l}$  por ratón, aproximadamente 0,2 MBq) y, 24 h después, con  $^{111}\text{In}$ -tetrazina (21  $\mu\text{g}/75\ \mu\text{l}$  por ratón, aproximadamente 0,8 MBq). Los resultados se visualizan en la figura 11. Tres horas después de la administración de tetrazina, los animales se anestesiaron con isoflurano y se sacrificaron por dislocación cervical. La sangre se extrajo por punción cardíaca y los órganos y tejidos de interés se recolectaron, secaron y pesaron. La radioactividad de las muestras se midió en un contador y junto con estándares para determinar el % de ID/g. Los márgenes de energía se establecieron en 10-80 keV y 100-510 keV para  $^{125}\text{I}$  y  $^{111}\text{In}$ , respectivamente. La radioactividad de la muestra se midió nuevamente 3 semanas después del experimento, para verificar los valores de  $^{125}\text{I}$  con respecto a la posible contaminación cruzada de  $^{111}\text{In}$ . Durante la evaluación *in vivo*, las especies yodadas no se sometieron a deshalogenación significativa, según lo evidencia la baja cantidad de  $^{125}\text{I}$  que se midió en tiroides y estómagos, y mostraron el patrón de distribución típico de los anticuerpos de circulación prolongada. Los  $^{125}\text{I}$ -mAbs residuales podían detectarse en sangre todavía (aprox. 10% de ID/g) y en órganos ricos en sangre, tales como el corazón y los pulmones (que se secaron pero no se perfundieron con solución salina antes de contar), 27 h después de la inyección. Todas las especies exhibieron depuración hepatobiliar (actividad de  $^{125}\text{I}$  en hígado e intestino) y algo de excreción renal (radiometabolitos más pequeños). Se observó baja absorción en músculo, hueso y cerebro. En los tumores, tanto CC49 como CC49-TCO exhibieron una alta acumulación con una relación tumor-sangre (T/B) de  $3,2\pm 2,2$  y  $2,8\pm 0,8$  y una relación tumor-músculo (T/M) de  $22,0\pm 10,8$  y  $34,2\pm 23,8$ , respectivamente. La variabilidad en la absorción de tumor se observó en ambos grupos, lo que probablemente se deba al crecimiento tumoral rápido e irregular (y, en consecuencia, a la variación del tamaño del tumor). Sin embargo, la acumulación tumoral de ambos constructos de CC49 fue significativamente mayor en comparación con Rtx-TCO (T/B=  $0,6\pm 0,0$ , T/M=  $4,9\pm 0,8$ ), lo que indica la unión específica de antígeno.

La distribución de  $^{111}\text{In}$ -tetrazina en los ratones que se trataron previamente con CC49-TCO o Rtx-TCO reflejó la de  $^{125}\text{I}$ . En estos grupos, se observó una alta absorción de  $^{111}\text{In}$  en sangre, corazón, pulmón e hígado, mientras que se encontró baja actividad en el bazo, músculo, hueso y cerebro. Los órganos donde no se encontraron diferencias significativas entre la absorción de  $^{125}\text{I}$ -CC49-TCO y  $^{125}\text{I}$ -Rtx-TCO (sangre, corazón, pulmón, bazo, músculo, hueso y cerebro) tampoco mostraron diferencias en la acumulación de  $^{111}\text{In}$ -tetrazina. Se encontró una absorción 5,2 veces mayor de  $^{111}\text{In}$ -tetrazina en los tumores que contenían  $18,8\pm 4,7\%$  de ID/g de  $^{125}\text{I}$ -CC49-TCO en comparación con los que contenían  $6,3\pm 1,2\%$  de ID/g de  $^{125}\text{I}$ -Rtx-TCO. Por otro lado, casi no se detectó absorción de  $^{111}\text{In}$  en la mayoría de los tejidos del grupo que se trataron previamente con  $^{125}\text{I}$ -CC49 sin modificar. Es importante destacar que, mientras que la absorción tumoral de  $^{125}\text{I}$ -CC49 fue la más alta entre los tres grupos, la absorción tumoral de  $^{111}\text{In}$  en este mismo grupo fue 16 veces menor que en el grupo de  $^{125}\text{I}$ -CC49-TCO. Además, la retención de sangre de  $^{111}\text{In}$ -tetrazina fue casi indetectable en este grupo a pesar de la presencia de  $8,7\pm 5,9\%$  de ID/g de  $^{125}\text{I}$ -CC49. Solo el riñón mostró una absorción relativamente alta de  $^{111}\text{In}$  en los 3 grupos como consecuencia de la excreción de tetrazina radiomarcada.

El descubrimiento de que la tetrazina se acumula solo en órganos y tejidos que contienen una especie modificada con TCO muestra que una reacción química entre estas dos entidades ocurrió *in vivo*. Se determinó el rendimiento de la reacción DA *in vivo* calculando la cantidad absoluta de TCO y tetrazina presente en los tejidos a partir del % de ID/g de  $^{125}\text{I}$  y  $^{111}\text{In}$ , respectivamente. De acuerdo con la alta reactividad y selectividad entre tetrazina y mAb-TCO que se observó *in vitro*,  $56,7\pm 2,0\%$  y  $52,1\pm 3,0\%$  de las fracciones de TCO presentes en sangre y tumor, respectivamente, habían reaccionado con una sonda de tetrazina en el grupo que se trató previamente con CC49-TCO. Estos rendimientos son notables considerando la baja concentración de los componentes involucrados en la reacción ( $0,42\pm 0,20$  y  $0,93\pm 0,23\ \text{nmol/g}$  en sangre y tumor, respectivamente, para TCO y un máximo de  $2,3\ \text{nmol/g}$  en sangre para la tetrazina directamente después de la inyección), la complejidad del medio de reacción y la corta vida media biológica de la tetrazina (11,8 min).

Experimentos de formación de imágenes.

Los ratones portadores de tumor se inyectaron con  $^{111}\text{In}$ -tetrazina (21  $\mu\text{g}/75\ \mu\text{l}$  por ratón, 20-42 MBq) 24 h después de recibir 100  $\mu\text{g}$  de mAb (CC49-TCO, CC49 o Rtx-TCO). Aproximadamente 1 h después, los ratones se anestesiaron y se colocaron en una cama para animales equipada con un cono nasal para anestesia y un sensor para monitoreo respiratorio. La tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT) se realizó 2 h después de la inyección de tetrazina con un sistema de imágenes SPECT/CT de animal pequeño de cuatro cabezales y múltiples cabezas de alfiler (NanoSPECT, Bioscan Inc., EE.UU.). La adquisición del SPECT (1 h en total) se realizó con cabezas de alfiler de 1,4 mm de diámetro y un tiempo de adquisición de 120-140 segundos por vista (24 proyecciones). El margen de energía para  $^{111}\text{In}$  se estableció en  $245\ \text{keV} \pm 15\%$  y  $171\ \text{keV} \pm 20\%$ . Los ratones se sacrificaron con una sobredosis de anestesia 3 h después de la inyección de tetrazina. Posteriormente, se realizaron exploraciones de alta resolución *post mortem* con cabezas de alfiler de 1,0 mm de diámetro y un tiempo de adquisición de 750 sec. por vista (32 proyecciones). Antes de cada sesión SPECT, se realizó una tomografía computarizada (2 segundos por proyección, 360 proyecciones) para obtener información anatómica sobre la distribución de radioactividad. Después de la adquisición, los datos se reconstruyeron iterativamente con el software del fabricante (InVivoScope 1.39, patch 1). Las regiones de interés (ROIs) se extrajeron manualmente por triplicado para tumor, hígado, riñón y muslo. Un fantasma relleno de una cantidad conocida de  $^{111}\text{In}$  se usó para calibrar el escáner para la cuantificación de la radioactividad del tejido.

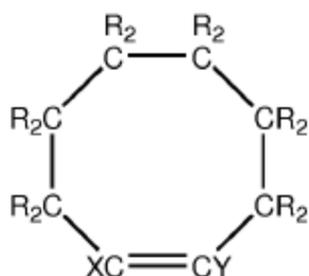
La absorción tumoral pronunciada de la  $^{111}\text{In}$ -tetrazina se demostró mediante formación de imágenes SPECT/CT de ratones vivos hasta 3 h después de la inyección (Fig. 12A/D; relación tumor-músculo (T/M)= 13,1). Se atribuyó la absorción limitada en tejidos no diana a la reacción con CC49-TCO de circulación residual. Es importante destacar que, en ratones tratados con CC49 sin modificar, el tumor no pudo discriminarse del tejido circundante (Fig. 12B/E, T/M= 0,5). Casi no se retuvo la radioactividad en la sangre y órganos no diana ya que la sonda se eliminó rápidamente a través del tracto urinario, lo que demuestra su bioortogonalidad. Ratones que se trataron con rituximab modificado con TCO, que carece de especificidad para TAG72, mostraron la retención esperada de  $^{111}\text{In}$ -tetrazina en sangre y órganos no diana, y una acumulación tumoral muy reducida (fig. 12C/F).

5

10

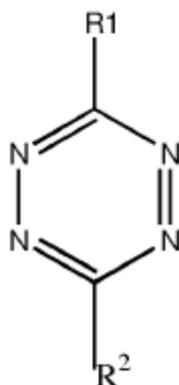
## REIVINDICACIONES

1. Un kit para formación de imágenes médicas y/o terapéuticas dirigidas, que comprende al menos una sonda de predirecciónamiento y al menos una sonda efectora, en el que la sonda de predirecciónamiento comprende una fracción de direcciónamiento primaria y un primer grupo reactivo bioortogonal, y en el que la sonda efectora comprende una fracción efectora, tal como un marcador o un compuesto farmacéuticamente activo, y un segundo grupo reactivo bioortogonal, en el que cualquiera de los grupos reactivos bioortogonales primero y segundo es un dienófilo y el otro de los grupos reactivos bioortogonales primero y segundo es un dieno, en el que el dienófilo es un dienófilo con anillo de 8 miembros cumple con la fórmula (1):



(1)

- en la que cada R indica de manera independiente H, o, en un máximo de seis casos, un sustituyente que se selecciona a partir del grupo que consiste en alquilo, O-alquilo, S-alquilo, F, Cl, Br, I, SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, NR'R'' con R' y R'' siendo cada uno de manera independiente H o alquilo, C(=O)Oalquilo, C(=O)Oarilo, CONR'R'' con R' y R'' siendo cada uno de manera independiente H, arilo o alquilo, OCOalquilo, OCOarilo, NR'COalquilo con R' siendo H o alquilo, NR'COarilo con R' siendo o alquilo, NR'C(=O)Oalquilo con R' siendo H o alquilo, NR'C(=O)Oarilo con R' siendo H o alquilo, OCONR'alquilo con R' siendo H o alquilo, OCONR'arilo con R' siendo H o alquilo, NR'CONR''alquilo con R' y R'' siendo cada uno de manera independiente H o alquilo, NR'CONR''arilo con R' y R'' siendo cada uno de manera independiente H o alquilo, NR'CSNR'' alquilo con R' y R'' siendo cada uno de manera independiente H o alquilo, y NR'CSNR'' arilo con R' y R'' siendo cada uno de manera independiente H o alquilo; con al menos un R comprendido en una fracción ligadora, de manera opcional a través de un espaciador, a la sonda de predirecciónamiento o a la sonda efectora, y en la que X e Y indican de manera independiente H, o un sustituyente que se selecciona a partir del grupo que consiste en alquilo, O-alquilo, S-alquilo, F, Cl, Br, I, SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> y NRR' con R y R' siendo cada uno de manera independiente H o alquilo, o formando en conjunto un enlace; y en la que el dieno se selecciona para que sea capaz de reaccionar con el dienófilo al someterse a cicloadición Diels-Alder continuando con una reacción retro Diels-Alder, y en la que el dieno cumple con la fórmula



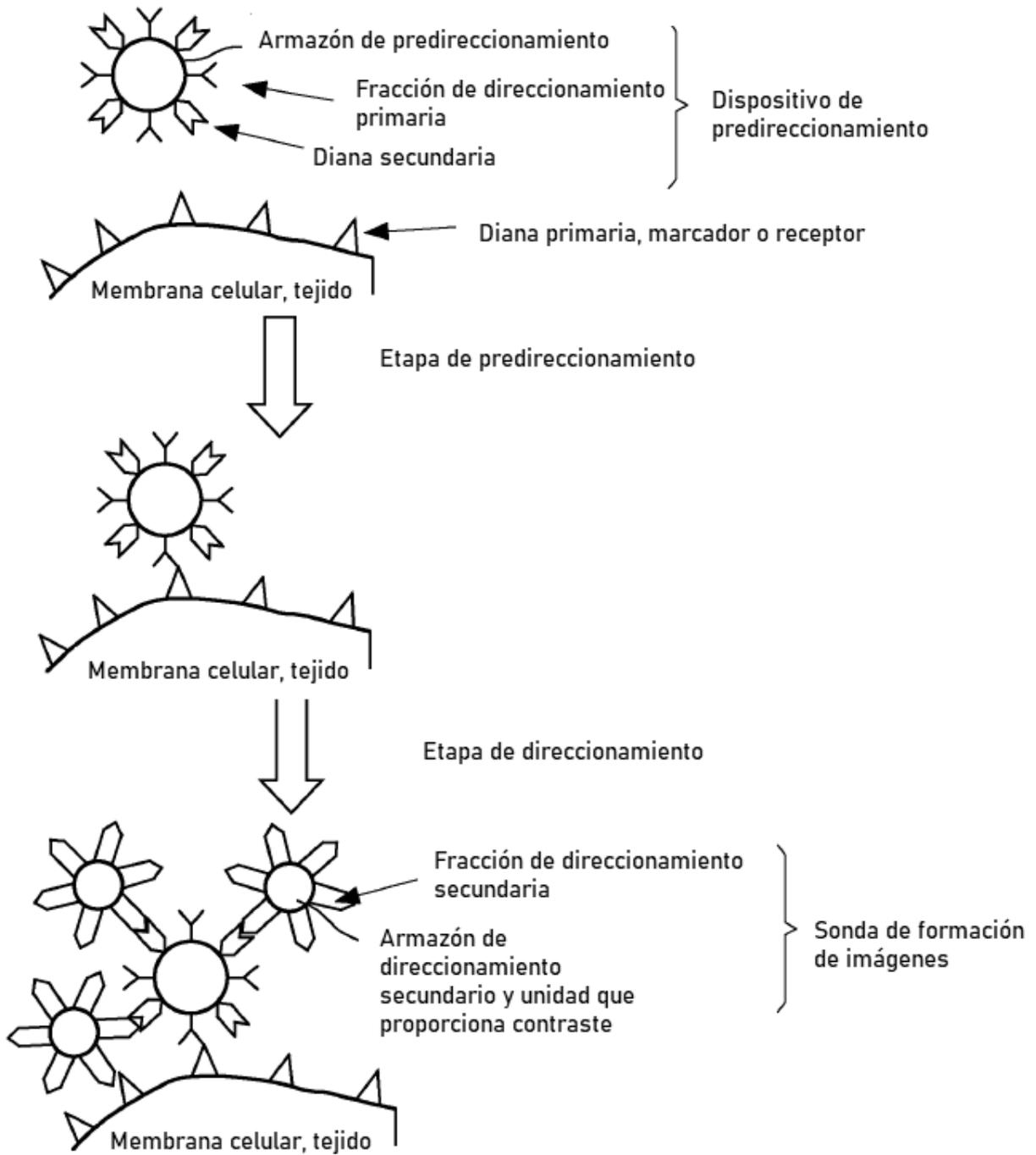
(7)

- en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> indican cada uno de manera independiente un sustituyente que se selecciona a partir del grupo que consiste en 2-piridilo, fenilo o fenilo sustituido con uno o más grupos de extracción de electrones como NO<sub>2</sub>, CN, COOH, COOR, CONH<sub>2</sub>, CONHR, CONR<sub>2</sub>, CHO, COR, SO<sub>2</sub>R, SO<sub>2</sub>OR, NO y Ar, en la que R es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y Ar representa un grupo aromático, en particular fenilo, piridilo o naftilo.

2. El kit de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha sonda efectora comprende una fracción estructural que puede formar un complejo de coordinación con un metal

3. El kit de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha fracción estructural es H4dota o H4dotma.

4. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sonda de predireccionamiento comprende, como una fracción de direccionamiento primaria, un anticuerpo.
- 5 5. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sonda efectora comprende, como una fracción efectora, un marcador detectable, preferiblemente un agente de contraste para uso en sistemas de formación de imágenes, que se selecciona a partir del grupo que consiste en agentes que pueden representarse en MRI, marcador espín, marcadores ópticos, agentes de respuesta a ultrasonidos, agentes de respuesta a rayos X, radionúclidos, y colorantes de tipo FRET, moléculas o etiquetas (bio) luminiscentes o fluorescentes, biotina, reactivos de imágenes paramagnéticas y reactivos de imágenes superparamagnéticas.
- 10 6. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sonda efectora comprende, como una fracción efectora, un compuesto farmacéuticamente activo.
- 15 7. El kit de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el compuesto farmacéuticamente activo es un isótopo que se selecciona a partir del grupo compuesto por  $^{24}\text{Na}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{76}\text{As}$ ,  $^{77}\text{As}$ ,  $^{80}\text{Br}$ ,  $^{82}\text{Br}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{90}\text{Nb}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{103}\text{Ru}$ ,  $^{105}\text{Ph}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{121}\text{Sn}$ ,  $^{127}\text{Te}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{140}\text{La}$ ,  $^{141}\text{Ce}$ ,  $^{142}\text{Pr}$ ,  $^{143}\text{Pr}$ ,  $^{144}\text{Pr}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{149}\text{Tb}$ ,  $^{151}\text{Pm}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Dy}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{169}\text{Er}$ ,  $^{172}\text{Tm}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{199}\text{Au}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{211}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{214}\text{Bi}$ ,  $^{223}\text{Ra}$ , y  $^{225}\text{Ac}$ .
- 20 8. Una sonda efectora según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende un isótopo que se selecciona a partir del grupo que consiste en  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{52}\text{Mn}$ ,  $^{55}\text{Co}$ ,  $^{60}\text{Cu}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{62}\text{Zn}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{63}\text{Zn}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{70}\text{As}$ ,  $^{71}\text{As}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{74}\text{As}$ ,  $^{75}\text{Se}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{80}\text{Br}$ ,  $^{82}\text{Br}$ ,  $^{82}\text{Rb}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{88}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{110}\text{In}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{113}\text{In}$ ,  $^{114}\text{In}$ ,  $^{117}\text{Sn}$ ,  $^{120}\text{I}$ ,  $^{122}\text{Xe}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{167}\text{Tm}$ ,  $^{169}\text{Yb}$ ,  $^{193}\text{Pt}$ ,  $^{195}\text{Pt}$ ,  $^{201}\text{Tl}$ , y  $^{203}\text{Pb}$ .
- 25 9. Un método que comprende administrar una sonda de pretratamiento según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 a un sujeto y permitiendo que la sonda circule en el sistema del sujeto durante un período de tiempo efectivo para lograr la unión de la fracción de direccionamiento primaria continuando con la depuración del agente no unido del cuerpo continuando con la administración de una sonda efectora según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 5 u 8, en el que los grupos reactivos bioortogonales en la sonda de predireccionamiento y en la sonda efectora forman en conjunto las parejas reactivas para una reacción retro Diels-Alder de tipo [4+2].
- 30 10. El método de la reivindicación 9, en el que dicha sonda efectora comprende un radionúclido que se usa para formación de imágenes que se selecciona a partir del grupo que consiste en  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{52}\text{Mn}$ ,  $^{55}\text{Co}$ ,  $^{60}\text{Cu}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{62}\text{Zn}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{63}\text{Zn}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{70}\text{As}$ ,  $^{71}\text{As}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{74}\text{As}$ ,  $^{75}\text{Se}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{77}\text{Br}$ ,  $^{80}\text{Br}$ ,  $^{82}\text{Br}$ ,  $^{82}\text{Rb}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{88}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{110}\text{In}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{113}\text{In}$ ,  $^{114}\text{In}$ ,  $^{117}\text{Sn}$ ,  $^{120}\text{I}$ ,  $^{122}\text{Xe}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{167}\text{Tm}$ ,  $^{169}\text{Yb}$ ,  $^{193}\text{Pt}$ ,  $^{195}\text{Pt}$ ,  $^{201}\text{Tl}$ , y  $^{203}\text{Pb}$ .
- 35 11. Un kit de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, para uso en terapia dirigida, preferiblemente radioterapia.



**FIG. 1**

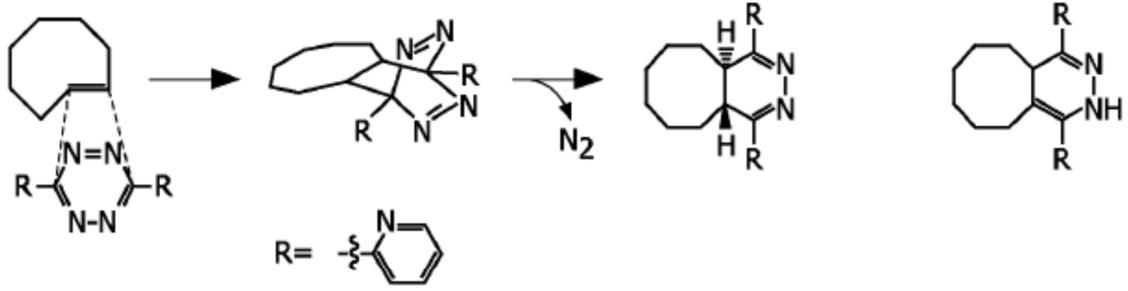


FIG. 2

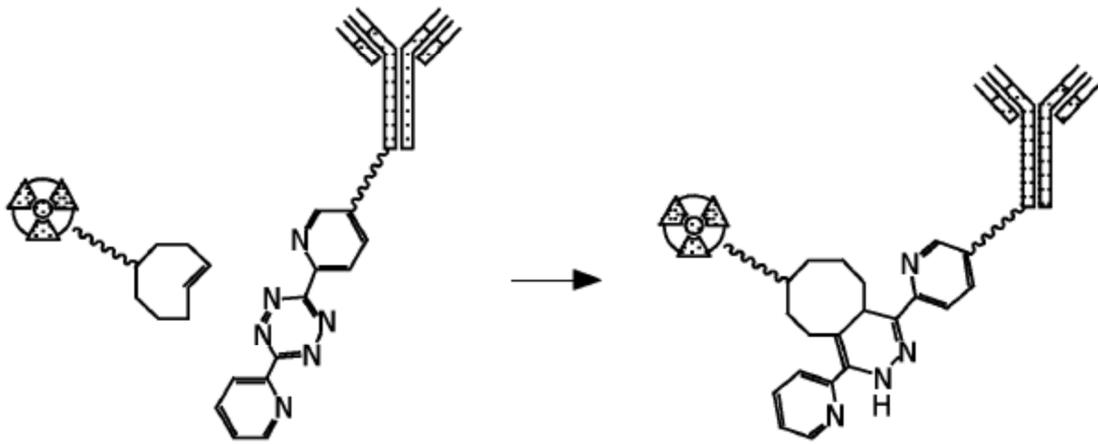


FIG. 3a

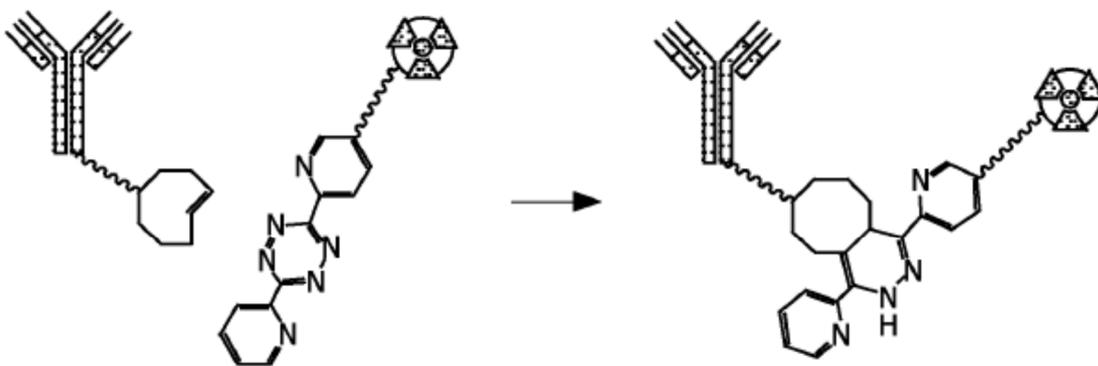


FIG. 3b

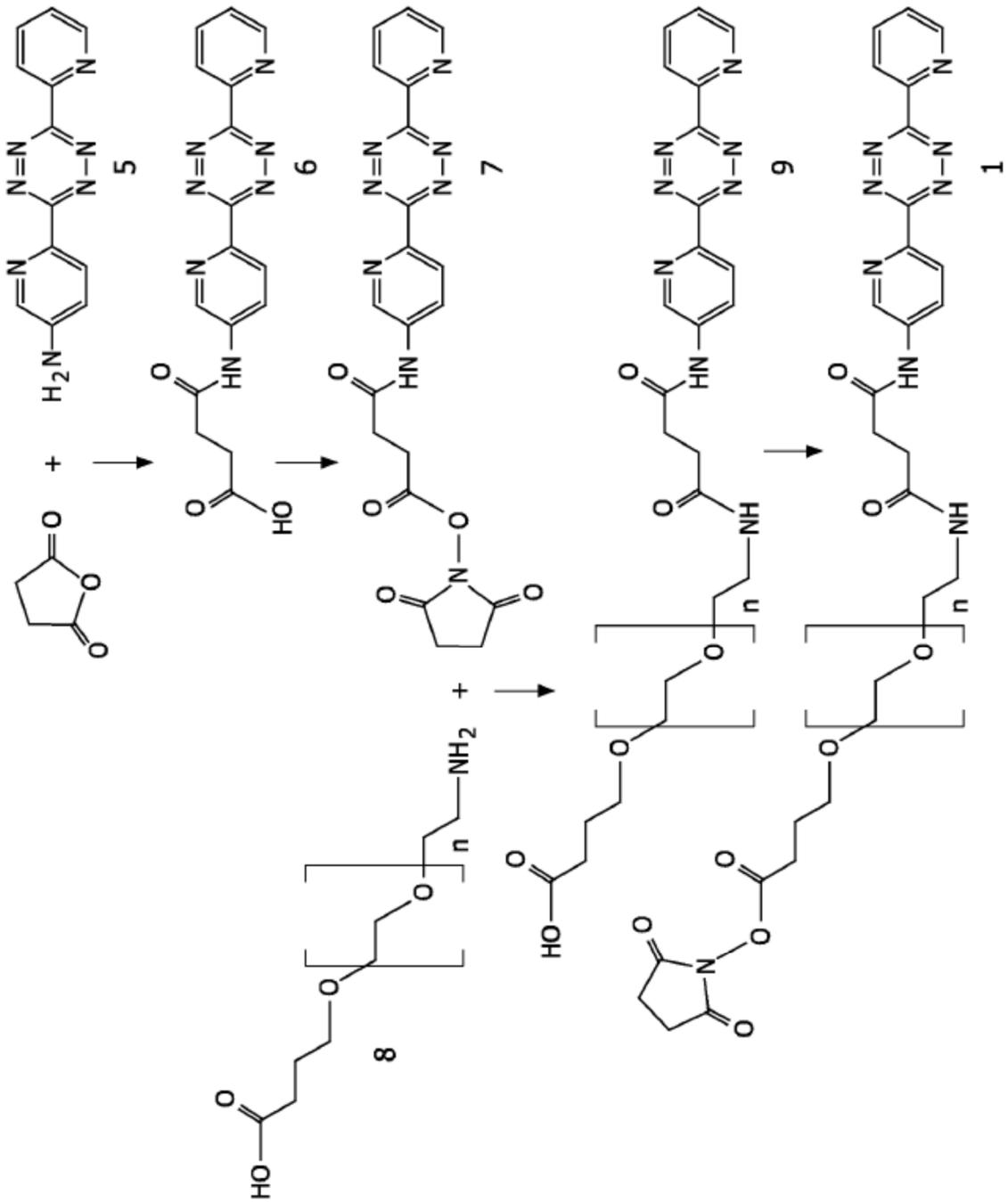


FIG. 4

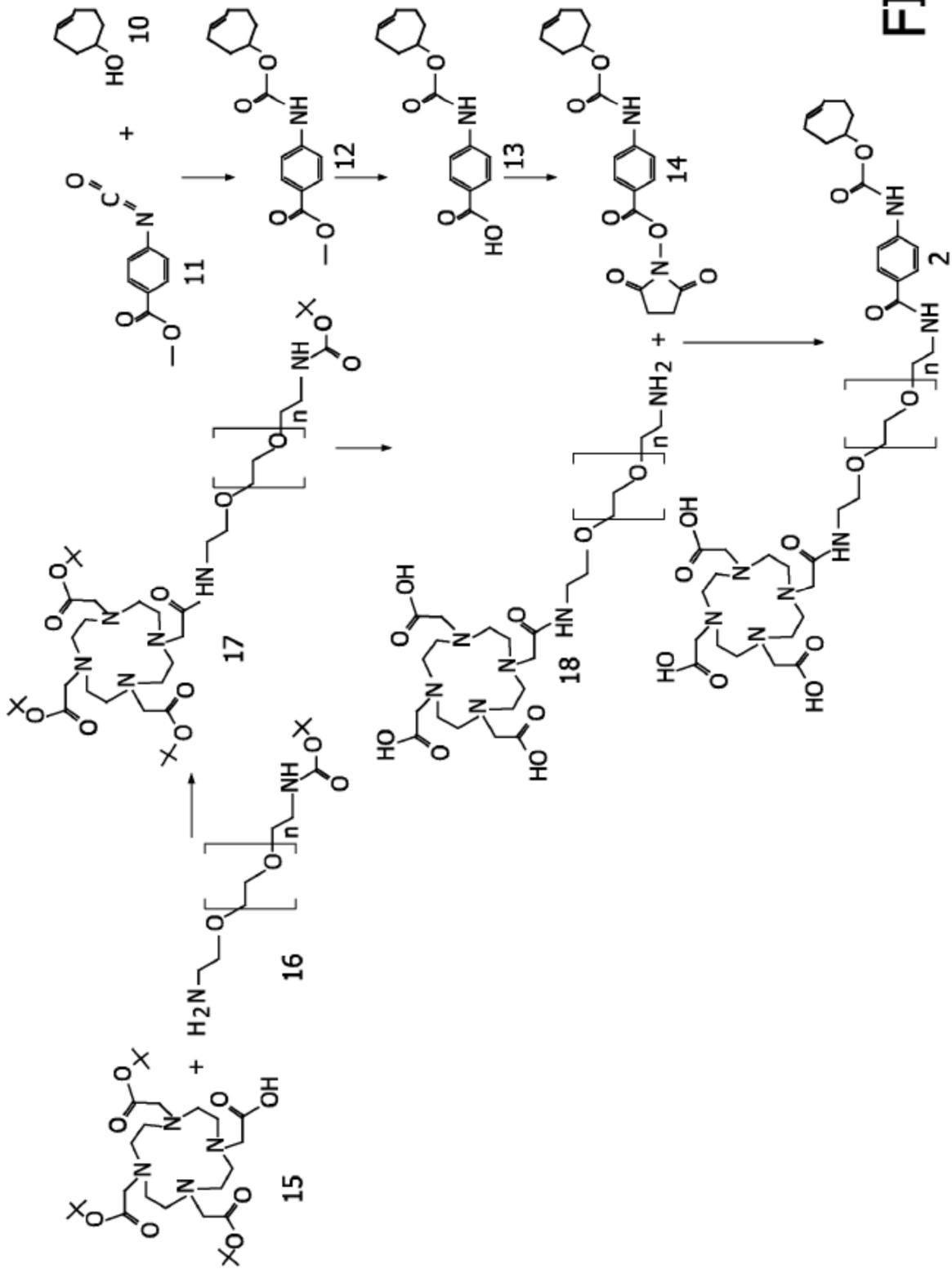


FIG. 5

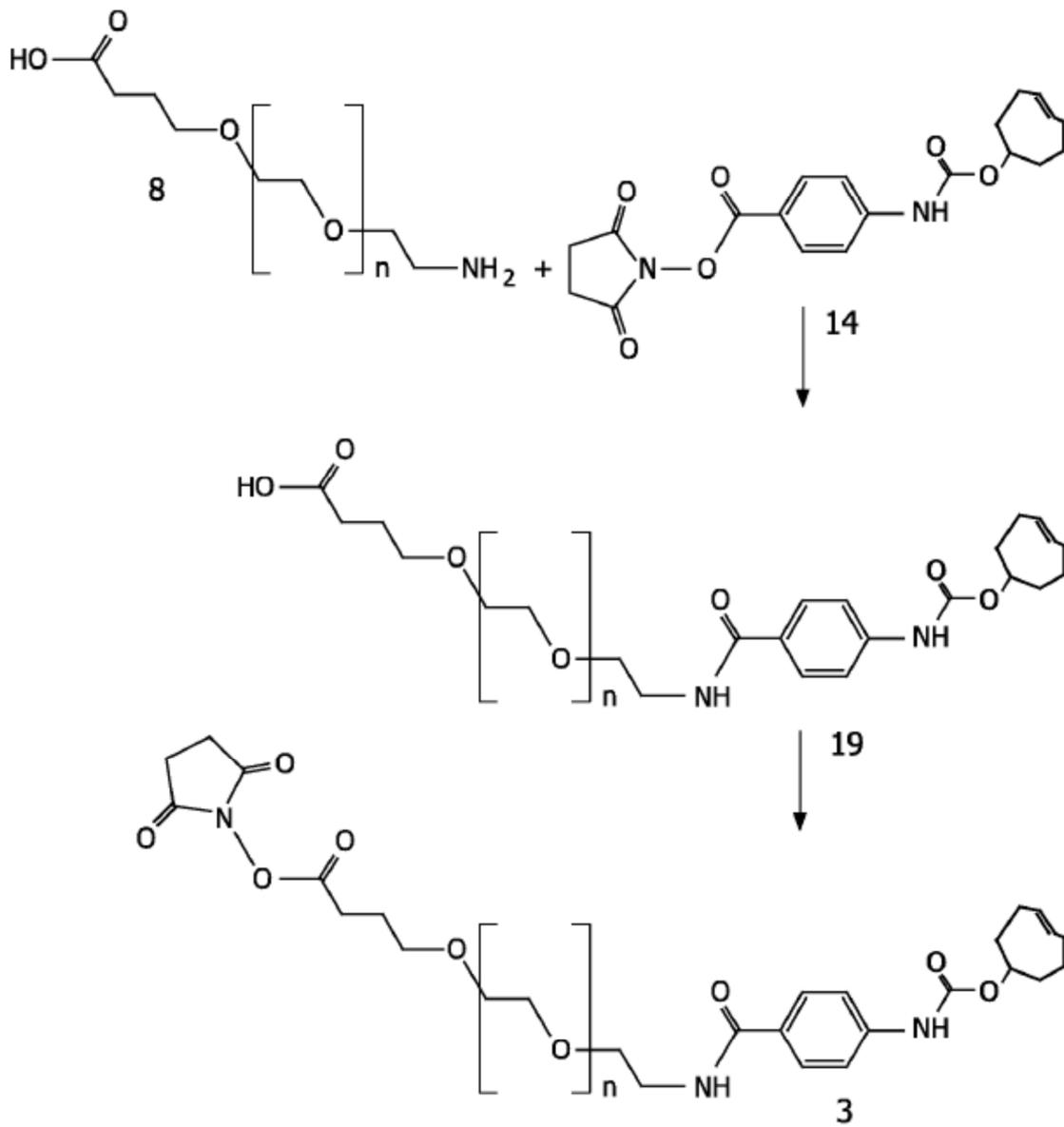


FIG. 6



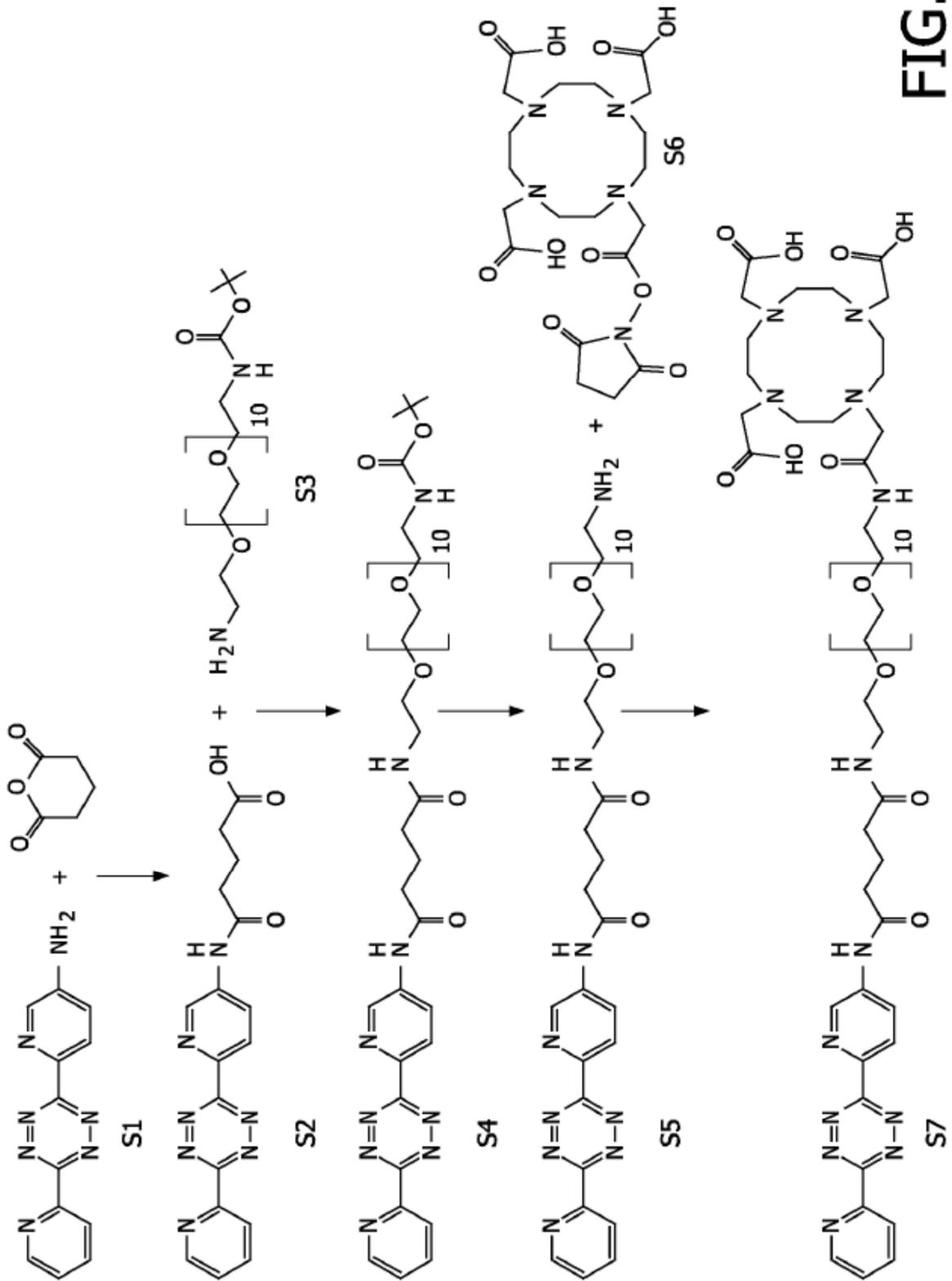


FIG. 8

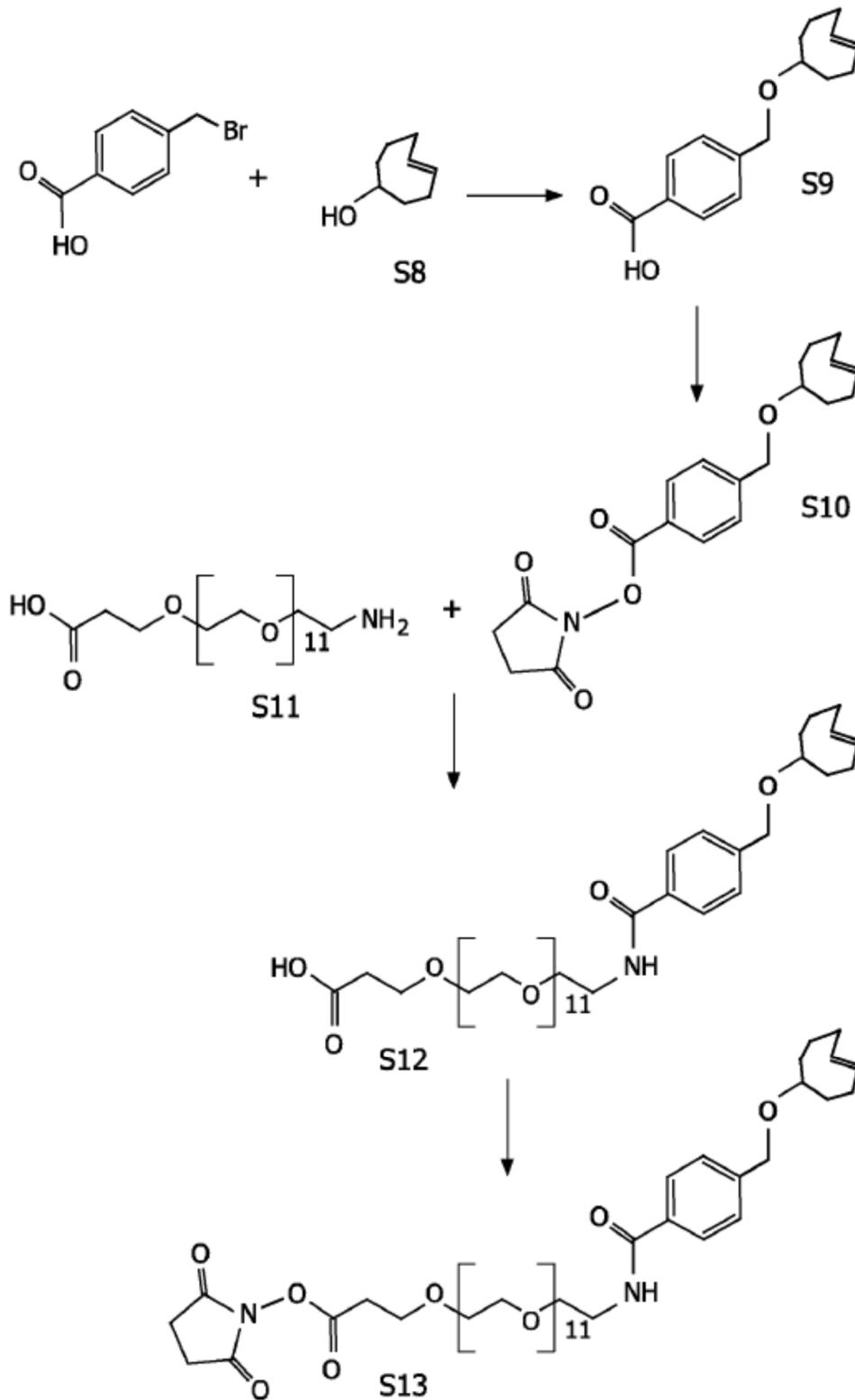


FIG. 9

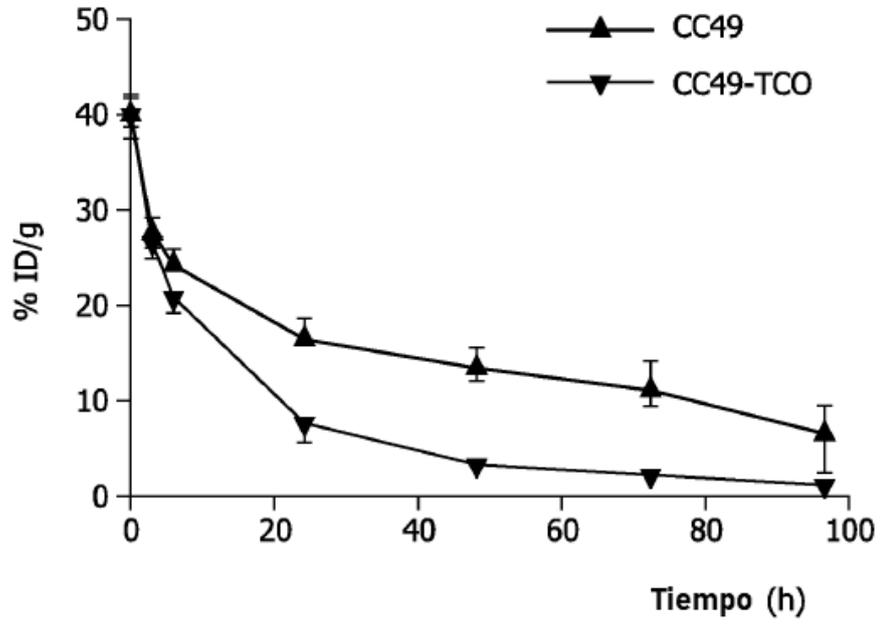


FIG. 10

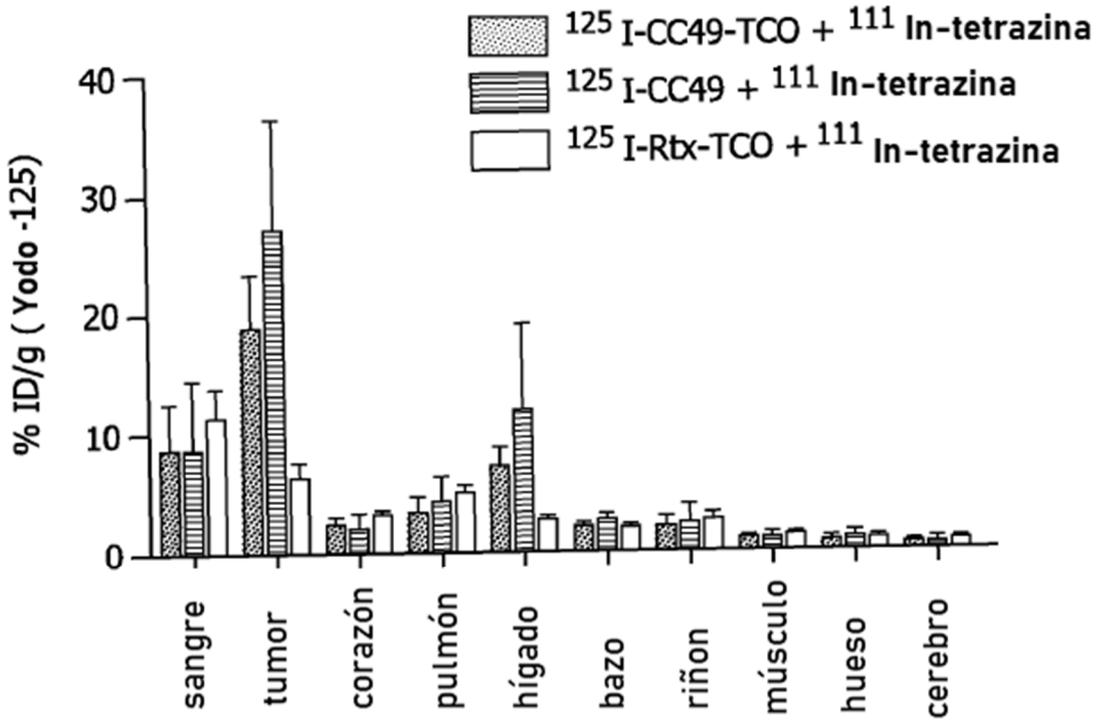


FIG. 11A

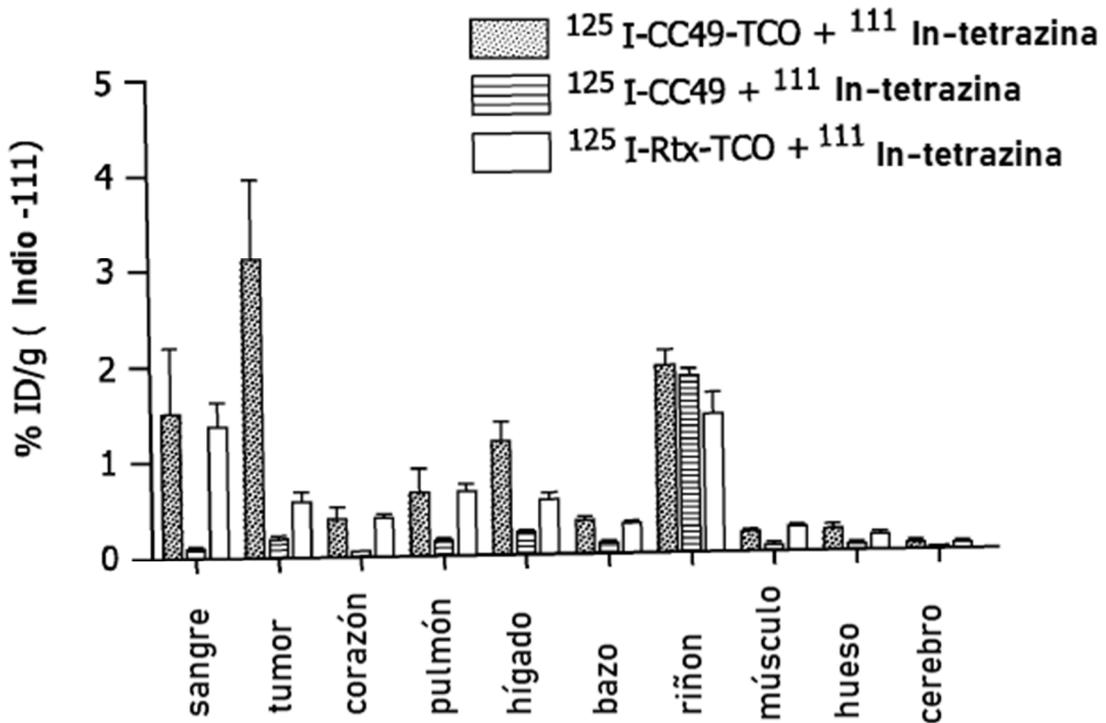


FIG. 11B

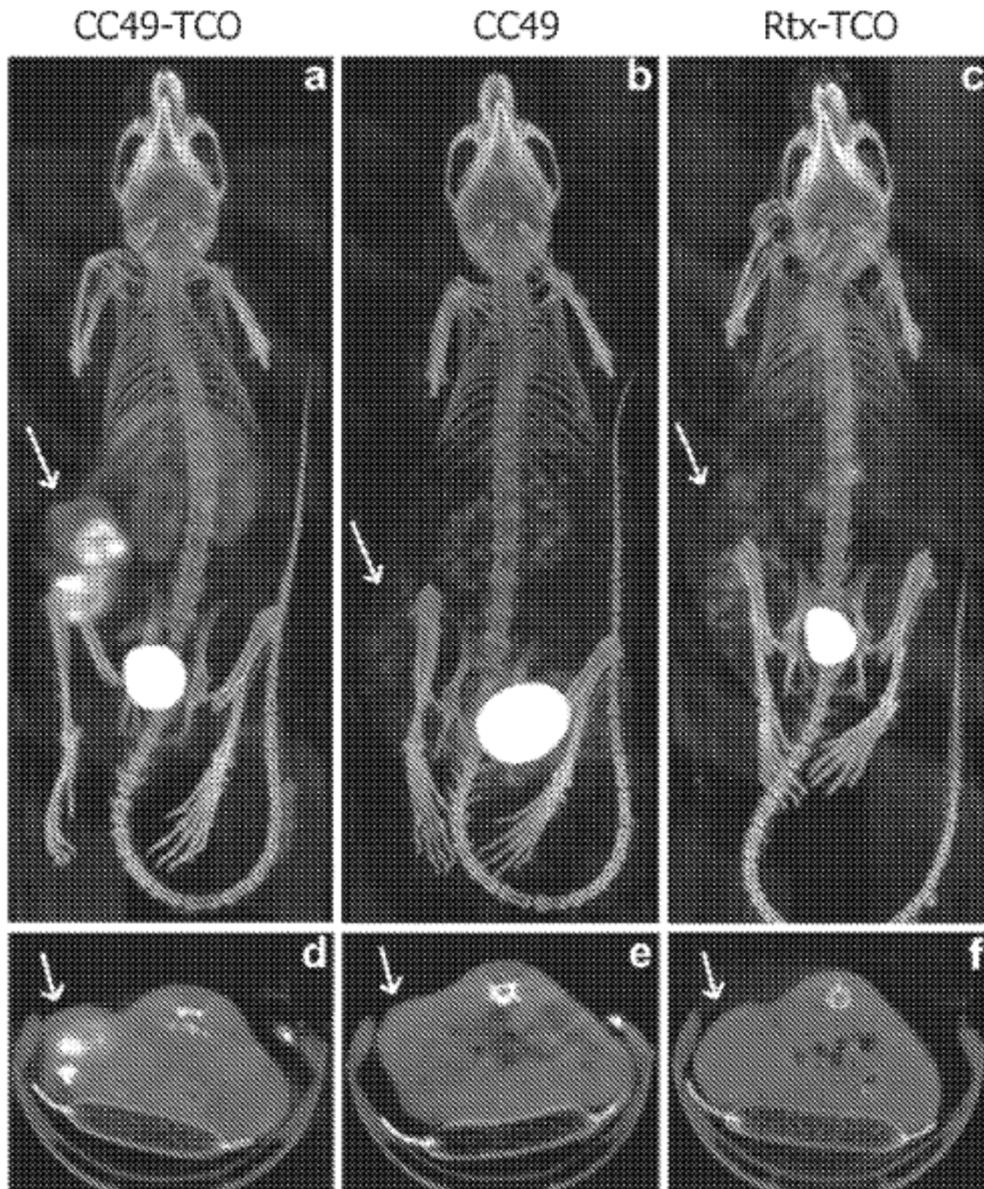


FIG. 12