

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 941 968**

51 Int. Cl.:

**A61K 51/10** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)  
**G01N 33/58** (2006.01)  
**C07K 16/24** (2006.01)  
**C12P 21/00** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.10.2016** **PCT/US2016/055074**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **06.04.2017** **WO17059397**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2016** **E 16852806 (5)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2023** **EP 3359573**

54 Título: **Marcaje de anticuerpos**

30 Prioridad:

**01.10.2015 US 201562236117 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.05.2023**

73 Titular/es:

**THE WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH (50.0%)**  
**Nine Cambridge Center**  
**Cambridge, MA 02142, US y**  
**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION D/B/A MASSACHUSETTS GENERAL HOSPITAL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RASHIDIAN, MOHAMMAD;**  
**PLOEGH, HIDDE L.;**  
**VASDEV, NEIL y**  
**LIANG, HUAN STEVEN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

### Observaciones:

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

ES 2 941 968 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

Marcaje de anticuerpos

## ANTECEDENTES

La tomografía por emisión de positrones (PET) es una tecnología poderosa para la obtención de imágenes médicas y biológicas, y el alcance de las aplicaciones de PET se está expandiendo rápidamente. El desarrollo de trazadores de PET adecuados es fundamental para la tecnología de PET.

El documento WO 2015/073746 A2 describe un método para marcar con un radiomarcador una proteína que tiene un motivo de reconocimiento de sortasa. El documento WO 2010/078376 A2 describe conjugados moleculares de anticuerpos en los que el conjugado puede radiomarcarse. El documento US 2011/195021 A1 describe un fragmento de anticuerpo anti-CD20 que puede radiomarcarse para aplicaciones de diagnóstico. El documento US 5 670 132 A describe un fragmento F(ab)<sub>2</sub> o F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpo radiomarcado con Tc-99m, y métodos para la preparación del mismo, y aplicaciones diagnósticas basadas en el mismo. El documento US 2015/086576 A1 describe un polipéptido que comprende un dominio VHH, en el que el dominio VHH se une a un complejo MHC Clase II, que puede comprender además un radioisótopo.

Sin embargo, el desarrollo de nuevos trazadores de PET basados en péptidos/proteínas sería útil para marcar específicamente tejidos en aplicaciones terapéuticas y/o de diagnóstico.

## SUMARIO

Algunos aspectos de la descripción se basan en el reconocimiento de que los fragmentos de unión de anticuerpos, y en particular el fragmento de anticuerpo de dominio único VHH, muestran una capacidad mejorada para detectar antígenos *in vivo* cuando el sitio se conjuga específicamente a un polímero hidrófilo (por ejemplo, PEG) y un radiomarcador (por ejemplo <sup>89</sup>Zr). Estos anticuerpos son útiles para, *entre otros*, detectar tumores e infiltración de linfocitos en los tumores *in vivo*. Por consiguiente, la presente descripción proporciona anticuerpos que están marcados específicamente en el sitio con un polímero hidrófilo y/o un radiomarcador.

El éxito de las inmunoterapias tal como la administración de anticuerpos monoclonales contra los inhibidores de puntos de control inmunitarios (por ejemplo, CTLA4, PD-1 en células T, y PD-L1) justifica el desarrollo de nuevos métodos, sistemas y composiciones para evaluar si una inmunoterapia sería beneficiosa para el tratamiento de pacientes. Como ejemplo, los macrófagos pueden afectar el crecimiento tumoral al establecer un microambiente perjudicial o favorable. Por lo tanto, la capacidad de obtener imágenes de la presencia de células mieloides es de relevancia diagnóstica y terapéutica, y en comparación con los marcadores específicos de tumores<sup>[1]</sup>, puede ser un enfoque de aplicación más general para la detección de células tumorales<sup>[2-3]</sup>. Las células inmunitarias a menudo invaden o rodean los tumores sólidos<sup>[1]</sup>. El éxito de las inmunoterapias tal como la administración de anticuerpos monoclonales contra los inhibidores de puntos de control inmunitarios (por ejemplo, CTLA4, PD-1 en células T, y PD-L1) puede evaluarse mediante imágenes de la presencia y/o distribución de células inmunitarias (es decir, células mieloides y/o linfoides) en un sujeto, por ejemplo en un tumor del sujeto. En consecuencia, se necesitan nuevos métodos y composiciones para explorar y evaluar el microentorno de los tumores de forma no invasiva.

Las células inmunitarias a menudo se infiltran en los tumores y, por lo tanto, pueden servir como indicador para evaluar la presencia de una neoplasia maligna. La capacidad de obtener imágenes de células infiltrantes de tumores depende de la disponibilidad de moléculas de direccionamiento con la afinidad y especificidad requeridas. Fragmentos de anticuerpo de dominio único derivados de camélidos (VHH). Se proporciona aquí el diseño y la síntesis de VHH PEGilados específicos de sitio y VHH bivalentes modificados condensados específicamente del sitio a través de sus extremos C. Los VHH, que reconocen los productos de MHC Clase II y CD11b, se usaron para obtener imágenes de las células inmunitarias, tanto *in vitro* como *in vivo*, por FACS, microscopía de dos fotones y tomografía por emisión de positrones (PET). Tanto los VHH PEGilados como los bivalentes tiñeron los órganos linfoides, y los tiñeron de forma más eficaz que sus equivalentes monovalentes no PEGilados. Mediante imágenes de PET, los VHH modificados detectaron melanoma injertado y tumores pancreáticos - tan pequeños como ~1 mm de tamaño - en virtud de su asociación con células mieloides. Los VHH modificados mostraron una mejora significativa en las imágenes de fluorescencia, especialmente para los VHH PEGilados.

En un aspecto, se escogió un enfoque químico para vincular dos VHH completamente funcionales y correctamente plegados a través de sus extremos C para garantizar que su capacidad de unión a antígeno no se vea comprometida por la modificación de uno de los extremos N, y que los dos sitios de unión así creados sería equivalentes, a la manera de un anticuerpo de tamaño completo. En consecuencia, los VHH bivalentes se produjeron mediante la aplicación de transformaciones enzimáticas mediadas por sortasa en combinación con química clic. Los VHH monovalentes y bivalentes se compararon en experimentos *in vitro* (FACS), por microscopía de dos fotones en los ganglios linfáticos y el bazo extirpados de ratones inyectados con VHH, y por imágenes inmuno-PET *in vivo* no invasiva.

Un enfoque de diagnóstico clínico mínimamente invasivo es el uso de tomografía por emisión de positrones de <sup>18</sup>F-2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa (FDG-PET), que distingue áreas de alta actividad metabólica, tales como tumores, del tejido circundante con menor captación de glucosa<sup>[4]</sup>. Es posible que estos métodos normalmente no proporcionen

información sobre las células inmunitarias en el microambiente tumoral. Se pueden usar para rastrear células inmunitarias, usando fragmentos de anticuerpos anti-CD 11b, anti-MHC Clase II y anti CD8 marcados isotópicamente<sup>[5-7]</sup>.

El tamaño comparativamente grande de los anticuerpos intactos de tamaño completo da como resultado una vida media circulatoria prolongada, y también puede dificultar la penetración eficaz en los tejidos<sup>[8]</sup>. Estas consideraciones han impulsado la búsqueda de formatos derivados de anticuerpos más pequeños como herramientas de imagen alternativas<sup>[1,6]</sup>. Por lo tanto, se proporcionan aquí fragmentos de anticuerpos de dominio único (VHH) de camélidos, tales como los derivados de unión a antígeno más pequeños que se pueden obtener a partir de anticuerpos naturales<sup>[9]</sup>. Los VHH pueden modificarse enzimáticamente y se han utilizado en una variedad de aplicaciones, incluida la obtención de imágenes<sup>[10]</sup>.

La producción de anticuerpos bivalentes de un solo dominio en función de sus equivalentes monovalentes podría abordar problemas de avidez, conservando al mismo tiempo propiedades deseables tal como el tamaño pequeño. Por ejemplo, los derivados bivalentes de anticuerpos de dominio único pueden ser lo suficientemente pequeños para penetrar en los tejidos, eliminarse rápidamente de la circulación y, sin embargo, beneficiarse de una mayor avidez. Por otro lado, ajustar la vida media circulatoria podría mejorar la eficiencia de tinción de las dianas por VHH. La unión de pequeños grupos de PEG (por ejemplo, PEGilación) u otros polímeros hidrófilos podría usarse como herramienta para ajustar la persistencia de un VHH en la circulación. Además, la PEGilación puede disminuir la inmunogenicidad de los VHH, lo cual es importante en los casos en que se requiere una administración repetida, pero en casos raros, incluso la funcionalidad de PEG en sí misma puede ser inmunogénica<sup>[2]</sup>. Por lo tanto, se proporcionan aquí métodos para introducir modificaciones específicas del sitio de polímeros hidrófilos (por ejemplo, PEG) y radiomarcadores (por ejemplo, <sup>89</sup>Zr) en anticuerpos de dominio único (por ejemplo, VHH), y métodos para producir anticuerpos de dominio único bivalentes conjugados específicamente con el sitio. Los anticuerpos de dominio único pueden modificarse específicamente en el sitio con PEG y <sup>89</sup>Zr. Sin embargo, debe apreciarse que se pueden usar polímeros hidrófilos adicionales y otros radiomarcadores para modificar los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de dominio único) proporcionados aquí.

Los detalles de la descripción se establecen en la Descripción Detallada, como se describe a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la descripción serán evidentes a partir de las Definiciones, Ejemplos, Figuras y Reivindicaciones.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los dibujos adjuntos, que constituyen parte de esta memoria descriptiva, ilustran varios ejemplos de la descripción y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la descripción. Los ejemplos descritos en los dibujos no limitan el alcance de esta descripción.

Figuras 1A-1B muestran el marcaje específico del sitio de anticuerpos de dominio único (VHH) utilizando sortasa, y el diseño (Figura 1A) así como (Figura 1B) las estructuras de los sustratos. LPETG-GH<sub>6</sub> es SEQ ID NO: 5; GGH<sub>6</sub> es SEQ ID NO: 6; LPET es SEQ ID NO: 7; LPET-G<sub>3</sub> es SEQ ID NO: 8.

Figuras 2A-2F muestran la síntesis de derivados de VHH (Figura 2A y Figura 2B). Se realizaron caracterizaciones en todos los productos (Figura 2C y Figura 2D). Aquí se muestra el análisis de LC-MS y SDS-PAGE para DC13. Los números indican lo siguiente: #1: marcador, #2: DC13, #3: DC13-DBCO, #4: DC13-azida-rojo Texas, #5: DC13-dímero-Rojo Texas, #6: DC13-azida-Alexa647, #7: DC13-dímero-Alexa647. (Figuras 2E-2F) PEGilación de los VHHs y caracterización. Los números indican lo siguiente: #1: marcador, #2: DC8-alexa647-azida, #3: DC8-alexa647-PEG-5kDa, #4: DC8-alexa647-PEG-10kDa, #5: DC8-alexa647-PEG-20 kDa. LPETG-XX es SEQ ID NO: 9; LPET-G<sub>3</sub> es SEQ ID NO: 8; LPET-G<sub>3</sub>-Cys es SEQ ID NO: 10.

Figuras 3A-3D (Figuras 3A-3B) muestran dímeros que son capaces de teñir sus dianas con mayor eficiencia en comparación con sus correspondientes monómeros; para Figura 3A: las células se tiñeron *in vitro* con las concentraciones indicadas de monómeros o dímeros de VHH marcados con Alexa647; para Figura 3B: se inyecta IV la misma cantidad de monómero DC8 y dímero DC8. 2 h p.i., los ratones se sacrifican, y los bazos se extirpan para obtener imágenes de dos fotones. (Figura 3C) Se inyecta IV la misma cantidad de DC8 con o sin PEG, ambos equipados con Rojo Texas. 3 h p.i., los ratones se sacrifican, y los bazos se extirpan para obtener imágenes de dos fotones. (Figura 3D) Se inyecta IV la misma cantidad de DC8 con o sin PEG (0,4 nmoles), todos equipados con Alexa647. 3 h p.i., los ratones se sacrifican, y el bazo se extirpa. Las células se recolectaron y analizaron con FACS.

Figuras 4A-4I (Figura 4A) muestra la síntesis de <sup>18</sup>F-Tetrazina. (Figura 4B) Marcaje con <sup>18</sup>F de dímeros de VHH, monómeros, o PEG-VHH. (Figura 4C) Análisis de radio-TLC de la reacciones de marcaje con <sup>18</sup>F. (Figuras 4D-4I) El dímero <sup>18</sup>F-DC8 y el dímero <sup>18</sup>F-DC13 detectan órganos linfoides y revelan células inmunitarias infiltradas en el tumor. Las imágenes de PET se representan tanto en vista coronal como sagital para una mejor visualización. Se proporcionan imágenes de TC para una mejor visualización (Figura 4H). (Figuras 4D-4E) Imágenes de PET de ratones WT (Figura 4D) y MHC-/- Clase II (Figura 4E) 2 h p.i. de dímero de <sup>18</sup>F-DC8; las letras indican: CV: ganglios linfáticos cervicales; MB: médula ósea; GB: vesícula biliar; LV: hígado; KD: riñones; Ints: intestinos; BL: vejiga; SP:

médula espinal. (Figuras 4F-4G) Imágenes de PET de ratones WT (Figura 4F) y CD11b<sup>-/-</sup> (Figura 4G) 2 h p.i. de dímero de <sup>18</sup>F-DC13. (Figura 4I) Células MHC+ Clase II asociadas a tumores (Figura 4I (coronal)) o células CD11b<sup>+</sup> (Figura 4I (sagital)) se visualizaron utilizando dímero de <sup>18</sup>F-DC13 (Figura 4I (coronal)) o dímero de <sup>18</sup>F-DC8 (Figura 4I (sagital)). Las flechas apuntan a los tumores. En (Figura 4I (sagital)), las estrellas muestran los ganglios linfáticos. Las barras de escala de PET tienen unidades arbitrarias. Las imágenes son representativas de dos a cuatro ratones con resultados similares.

Figuras 5A-5D (Figuras 5A-5B) muestran la biodistribución post mortem de los <sup>18</sup>F-VHH en todos los órganos. A los ratones se les inyectó la misma cantidad de cualquiera <sup>18</sup>F-VHH o dímero de <sup>18</sup>F-VHH. 3 h p.i., los ratones se sacrificaron, y se midió la actividad en diferentes órganos. (Figura 5C) El monómero de VHH puede bloquear la unión de dímero de <sup>18</sup>F-VHH en los órganos linfoides. A los ratones WT se les inyectó una cantidad diferente de DC8 sin marcar. El dímero de <sup>18</sup>F-DC8 se inyectó 20 min más tarde. Los PET SUV se calculan sobre la base de imágenes de PET adquiridas 2 h p.i. del dímero de DC8 marcado con <sup>18</sup>F. (Figura 5D) A los ratones WT se les inyectó la misma cantidad de <sup>18</sup>F-DC8 con o sin PEG marcados. 3 h p.i., los ratones se sacrificaron, y se midió la actividad en diferentes órganos.

Figuras 6A-6H muestran el análisis de LC-MS de los VHH, sus correspondientes productos clasificados y dímeros. DC8 y sus derivados (Figuras 6A-6H).

Figuras 7A-7H muestran el análisis de LC-MS de los VHH, sus correspondientes productos clasificados y dímeros. DC13 y sus derivados (Figuras 7A-7H).

Figura 8 Muestra una tabla de rendimiento radioquímico (sin corrección por desintegración) y un cromatograma de radio HPLC. La columna era luna 5u C18 100 Å 250 x 4,6 mm, la fase móvil fue 60% de CH<sub>3</sub>CN, 40% de NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub>(aq) 0,1 M, y el caudal fue 1ml/min.

Figura 9 Muestra un esquema del colector de síntesis automatizado del módulo de radiosíntesis GE TRACERlab™ FXFN para [<sup>18</sup>F]-5.

Figura 10 muestra una traza de HPLC semipreparativa de una radiosíntesis típica de [<sup>18</sup>F]-5.

Figura 11 muestra que el cartucho PD-10 se eluyó con PBS (10 x 500 µl), y cada fragmento se recogió en un tubo nuevo de 1,5 ml. El producto deseado, los [<sup>18</sup>F]-VHH, normalmente eluyeron en los tubos #4-7. Caracterización (usando dímero de [<sup>18</sup>F]-DC8 como ejemplo): cromatografía de rTLC (panel izquierdo [<sup>18</sup>F]-Tz 5; panel derecho dímero de [<sup>18</sup>F]-DC8; a los 20 minutos).

Figura 12 muestra la recolección de fragmentos a través del cartucho PD-10. Después de la cromatografía de exclusión por tamaño, se obtuvo un rendimiento radioquímico del 47 ± 9 % (n = 5, sin corrección por desintegración).

Figuras 13A-13B muestran espectros de RMN de [<sup>19</sup>F]tetrazina 5: RMN <sup>1</sup>H (Figura 13A) y RMN <sup>13</sup>C (Figura 13B).

Figuras 14A-14E muestran un esquema de un anticuerpo sólo de cadena pesada de camélido y una IgG convencional. Se muestra una porción de VHH dentro del círculo indicado por la flecha (Figura 14A). La Figura 14B es una representación esquemática del marcaje de los VHH específico del sitio usando sortasa. LPETG-XX es SEQ ID NO: 9.

Figuras 15A-15B muestra la estructura del sustrato de sortasa biortogonal sintetizado (Figura 15A). La funcionalidad de azida permite la instalación de grupos PEG, y el quelante DFO se usa para instalar radiometal <sup>89</sup>Zr, que permite la obtención de imágenes de PET. La Figura 15B es una representación esquemática de la preparación de VHH marcados con <sup>89</sup>Zr PEGilados, para imágenes de PET.

Figuras 16A-16B muestra que <sup>89</sup>Zr-PEGilado-VHH7 detecta órganos linfoides secundarios y tumor B16 en un ratón B6 de tipo salvaje al que se le han inyectado células tumorales B16 (Figura 16A), y <sup>89</sup>Zr-PEGilado-VHH7 detecta órganos linfoides secundarios en un ratón B6 de tipo salvaje al que no se le han inyectado células tumorales B16 (Figura 16B).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los anticuerpos son actualmente la clase de sustancias terapéuticas de crecimiento más rápido. Aunque los anticuerpos desnudos han demostrado su valor como productos farmacéuticos exitosos, adolecen de algunas limitaciones, tal como una baja penetración en los tejidos y una larga vida media circulatoria. Se han conjugado con cargas útiles tóxicas, PEG u otros polímeros, o radioisótopos, para incrementar y optimizar su eficacia terapéutica. Aunque la conjugación no específica es adecuada para la mayoría de las aplicaciones *in vitro*, para aplicaciones *in vivo*, los anticuerpos modificados en sitios específicos pueden tener ventajas. Aquí se proporciona un enfoque novedoso en el que un fragmento de anticuerpo se marca con dos etiquetas: una se usa para la introducción de un fluoróforo o un radioisótopo, y la segunda se usa para modificar aún más el fragmento con funcionalidades que incluyen un resto PEG o un segundo fragmento de anticuerpo. Tales modificaciones pueden mejorar las propiedades deseadas

(por ejemplo, vida media circulatoria o avidéz). Anticuerpos ejemplares (por ejemplo, anticuerpos de dominio único) proporcionados aquí, que reconocen epítomos, tales como MHC Clase II y CD11b mostraron una alta avidéz y especificidad. Los anticuerpos conjugados con un polímero hidrófilo (por ejemplo, PEG) y/o un fluoróforo pueden denominarse constructos. Tales constructos se usaron para obtener imágenes de cánceres y podrían detectar tumores tan pequeños como alrededor de 1 mm de tamaño.

El término “anticuerpo”, como se usa aquí, se refiere a una proteína que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Los términos anticuerpo e inmunoglobulina se usan indistintamente. El término “anticuerpo” abarca un anticuerpo intacto, un anticuerpo de dominio único, un anticuerpo de dominio único VHH, un fragmento Fv monocatenario (scFv), Fab, o un diacuerpo. Con algunas excepciones, los anticuerpos de mamíferos suelen estar formados por unidades estructurales básicas, cada una con dos cadenas pesadas grandes y dos cadenas ligeras pequeñas. Hay varios tipos diferentes de cadenas pesadas de anticuerpos y varios tipos diferentes de anticuerpos, que se agrupan en diferentes isotipos según la cadena pesada que posean. Se conocen cinco isotipos de anticuerpos diferentes en mamíferos, IgG, IgA, IgE, IgD e IgM, que desempeñan diferentes funciones y ayudan a dirigir la respuesta inmunitaria adecuada para cada tipo diferente de objeto extraño que encuentran. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo IgG, por ejemplo un anticuerpo de la subclase humana IgG1, 2, 3 o 4. Anticuerpos de especies de mamíferos (por ejemplo, humanos, ratones, ratas, cabras, cerdos, caballos, vacas, camellos) están dentro del alcance del término, al igual que los anticuerpos de especies no mamíferas (por ejemplo, de aves, reptiles, anfibios) también están dentro del alcance del término, por ejemplo anticuerpos IgY.

Sólo una parte de un anticuerpo está implicada en la unión del antígeno, y los fragmentos de anticuerpos que se unen al antígeno, su preparación y uso, son bien conocidos por los expertos en la técnica. Como es bien conocido en la técnica, sólo una pequeña porción de una molécula de anticuerpo, el paratopo, está involucrada en la unión del anticuerpo a su epítipo (véase, en general, Clark, W.R. (1986) *The Experimental Foundations of Modern Immunology* Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991) *Essential Immunology*, 7ª Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford). Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos adecuados para uso en el contexto de la presente descripción incluyen, por ejemplo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de dominio, fragmentos F(ab'), F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv, Fc y Fd, anticuerpos en los que las regiones Fc y/o FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han reemplazado por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han reemplazado por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han reemplazado por secuencias homólogas humanas o no humanas; y anticuerpos en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 se han reemplazado por secuencias homólogas humanas o no humanas. Los denominados anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv), anticuerpos de dominio (único) y otros anticuerpos intracelulares pueden usarse en el contexto de la presente descripción. Los anticuerpos de dominio, los anticuerpos de camélidos y camelizados y sus fragmentos, por ejemplo los dominios VHH, o los nanocuerpos, tales como los descritos en las patentes y las solicitudes de patentes publicadas de Ablynx NV y Domantis, también se incluyen en el término anticuerpo. Además, los anticuerpos quiméricos, por ejemplo anticuerpos que comprenden dos dominios de unión a antígeno que se unen a diferentes antígenos, también son adecuados para su uso en la presente descripción. El término anticuerpo también puede referirse a “miméticos de anticuerpos”, que son compuestos orgánicos que pueden unirse específicamente a antígenos, pero que no están relacionados estructuralmente con los anticuerpos. Por ejemplo, los miméticos de anticuerpos conocidos como “aficuerpos” o “moléculas de aficuerpos” son proteínas pequeñas diseñadas para unirse, por ejemplo, a proteínas o péptidos diana con afinidades comparables a los anticuerpos monoclonales. Un aficuerpo puede incluir un andamiaje proteico basado en el dominio Z (el dominio de unión de la inmunoglobulina G) de la proteína A, y a diferencia de los anticuerpos, las moléculas de aficuerpo están compuestas por hélices alfa y carecen de puentes disulfuro. Se conocen métodos para diseñar y producir aficuerpos, e incluyen los descritos en Nord et al., “A combinatorial library of an  $\alpha$ -helical bacterial receptor domain.” *Prot. Eng.* 1995; 8 (6): 601-608; Nord et al., “Binding proteins selected from combinatorial libraries of an  $\alpha$ -helical bacterial receptor domain.” *Nature Biotechnol.* 1997; 15 (8): 772-777; Stahl et al., “The use of gene fusions to protein A and protein G in immunology and biotechnology.” *Pathol. Biol. (Paris)* 1997; 45 (1): 66-76; Rönnmark et al., “Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*.” *J. Immunol. Methods.* 2002; 261 (1-2): 199-211; Rönnmark et al., “Affibody-beta-galactosidase immunoconjugates produced as soluble fusion proteins in the *Escherichia coli* cytosol.” *J. Immunol. Methods.* 2003; 281 (1-2): 149-160; Nord et al., “Recombinant human factor VIII-specific affinity ligands selected from phage-displayed combinatorial libraries of protein A.” *Eur. J. Biochem.* 2001; 268 (15): 1-10; Engfeldt et al., “Chemical synthesis of triple-labeled three-helix bundle binding proteins for specific fluorescent detection of unlabeled protein.” *Chem. BioChem.* 2005; 6 (6): 1043-1050; Ahlgren et al., “Targeting of HER2-expressing tumors with a site-specifically 99mTc-labeled recombinant affibody molecule, ZHER2:2395, with C-terminally engineered cysteine.” *J. Nucl. Med.* 2009; 50 (5): 781-789; Orlova et al., “Evaluation of [(111/114m)In]CHX-A”-DTPA-ZHER2:342, an affibody ligand conjugate for targeting of HER2-expressing malignant tumors.” *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2007; 51 (4): 314-23; Tran et al., “(99m)Tc-maEEE-Z(HER2:342), an Affibody molecule-based tracer for the detection of HER2 expression in malignant tumors.” *Bioconjug. Chem.* 2007; 18 (6): 1956-64; Orlova et al., “Tumor imaging using a picomolar affinity HER2 binding affibody molecule.” *Cancer Res.* 2006; 66 (8): 4339-48; Holm et al., “Electrophilic Affibodies Forming Covalent Bonds to Protein Targets.” *The Journal of Biological Chemistry* 2009; 284 (47): 32906-13; Renberg et al., “Affibody molecules in protein capture microarrays: evaluation of multidomain ligands and different detection formats.” *J. Proteome Res.* 2007; 6 (1): 171-179; Lundberg et al., “Site-specifically conjugated anti-HER2 Affibody molecules as one-step reagents for target expression analyses on cells and xenograft samples.” *J. Immunol. Methods* 2007; 319 (1-

2): 53-63; Tolmachev et al., "Radionuclide therapy of HER2-positive microxenografts using a <sup>177</sup>Lu-labeled HER2-specific Affibody molecule." *Cancer Res.* 2007; 67 (6): 2773-82; and Gebauer & Skerra, "Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics." *Current Opinion in Chemical Biology* 2009; 13 (3): 245-55; Siontorou C., "Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy." *Int. J. Nanomedicine* 2013; 8: 4215-4227.

- 5 La expresión "fragmento de anticuerpo de unión a antígeno", como se usa aquí, se refiere a un fragmento de un anticuerpo que comprende el paratopo, o un fragmento del anticuerpo que se une al antígeno al que se une el anticuerpo, con especificidad y afinidad similares a las del anticuerpo intacto. Los anticuerpos, por ejemplo anticuerpos monoclonales totalmente humanos, pueden identificarse mediante presentación en fagos (u otros métodos de presentación tales como presentación en levadura, presentación en ribosomas, presentación en bacterias). Las bibliotecas de presentación, por ejemplo bibliotecas de presentación en fagos, están disponibles (y/o pueden ser generadas por un experto normal en la técnica) que pueden examinarse para identificar un anticuerpo que se une a un antígeno de interés, por ejemplo utilizando inmunoadsorción ("*panning*"). Véase, por ejemplo, Sidhu, S. (ed.) *Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery* (Drug Discovery Series; CRC Press; 1ª ed., 2005; Aitken, R. (ed.) *Antibody Phage Display: Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology) Humana Press; 2ª ed., 2009).
- 10
- 15 La expresión "anticuerpo de dominio único", como se usa aquí, se refiere a un anticuerpo en el que las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) son parte de un polipéptido de dominio único, es decir las regiones determinantes de la complementariedad están todas en una sola cadena polipeptídica. Los ejemplos de anticuerpos de dominio único incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de cadena pesada, anticuerpos naturalmente desprovistos de cadenas ligeras, anticuerpos de dominio único derivados de anticuerpos convencionales de 4 cadenas, anticuerpos manipulados, y armazones de dominio único distintos de los derivados de anticuerpos. Los anticuerpos de dominio único pueden ser cualquiera de los conocidos en la técnica, o cualquier futuro anticuerpo de dominio único. Los métodos para obtener anticuerpos de dominio único y los VHH son conocidos en la técnica, y serían evidentes para el experto. Por ejemplo, los métodos para obtener anticuerpos de dominio único y los VHH se proporcionan en la publicación de patente U.S. nº: US 2006/0034845, publicada el 16 de febrero de 2006. Los anticuerpos de dominio único pueden derivar de cualquier especie, incluidas, pero sin limitarse a, ratón, rata, ser humano, camello, llama, cabra, conejo, y bovino. De acuerdo con un aspecto de la descripción, un anticuerpo de dominio único como se usa aquí es un anticuerpo de dominio único de origen natural conocido como un anticuerpo de cadena pesada desprovisto de cadenas ligeras. Dichos anticuerpos de dominio único se describen en la solicitud PCT internacional publicada WO 2013/024059. El dominio variable derivado de un anticuerpo de cadena pesada naturalmente desprovisto de cadena ligera se conoce como VHH o nanocuerpo, para distinguirlo del VH convencional de inmunoglobulinas de cuatro cadenas. Tal molécula de VHH puede derivar de anticuerpos producidos en especies de Camelidae, por ejemplo camello, dromedario, llama, vicuña, alpaca, y guanaco. Otras especies, además de Camelidae, pueden producir anticuerpos de cadena pesada naturalmente desprovistos de cadena ligera; dichos VHH están dentro del alcance de la descripción. Como se usa aquí, un "VHH" se refiere a la región variable de un anticuerpo de cadena pesada, por ejemplo el anticuerpo de cadena pesada de un camélido. Los VHH, útiles en la presente descripción y conocidos por el experto, pueden ser dominios variables de cadena pesada derivados de inmunoglobulinas naturalmente desprovistas de cadenas ligeras, tales como los derivadas de Camelidae, tal como se describe en la solicitud PCT internacional publicada, WO 2013/024059, publicada el 21 de febrero de 2013 (y denominados en lo sucesivo como dominios VHH o nanocuerpos). Por lo general, las moléculas de VHH son alrededor de 10 veces más pequeñas que las moléculas de IgG. Por ejemplo, las moléculas de VHH pueden tener un tamaño entre 10 kDa y 50 kDa, entre 10 kDa y 25 kDa, entre 12 kDa y 16 kDa. Los VHH pueden prestarse a transformaciones enzimáticas catalizadas por sortasa para una variedad de fines, incluida la instalación de radioisótopos y/o modificaciones de PEG para la administración a un sujeto y la obtención de imágenes (por ejemplo, imágenes de PET). Son polipéptidos únicos y son estables, resistiendo condiciones extremas de pH y temperatura. Tienen la ventaja de su especificidad, tamaño pequeño, y aclaramiento circulatorio rápido (<30 min). Los VHH proporcionados aquí pueden modificarse (por ejemplo, con un polímero, tal como PEG, y/o un marcador detectable) para producir propiedades mejoradas para la detección eficiente de una o más moléculas, proteínas o células, por ejemplo *in vivo*. Además, los VHH son resistentes a la acción de las proteasas, lo que no ocurre con los anticuerpos convencionales. Además, la expresión *in vitro* de los VHH produce VHH funcionales correctamente plegados con alto rendimiento. Además, los anticuerpos generados en camélidos reconocerán epítopos distintos a los reconocidos por los anticuerpos generados *in vitro* mediante el uso de bibliotecas de anticuerpos o mediante la inmunización de mamíferos distintos de los camélidos (en solicitud PCT internacional publicada, WO 2006/079372, publicada el 3 de agosto de 2006). Dado que se sabe que los VHH se unen a epítopos "inusuales", tales como cavidades o surcos (documento WO 2006/079372), la afinidad de dichos VHH puede ser más adecuada para fines de diagnóstico. Los anticuerpos de dominio único útiles en la presente descripción pueden producirse mediante cualquier método conocido en la técnica.
- 55

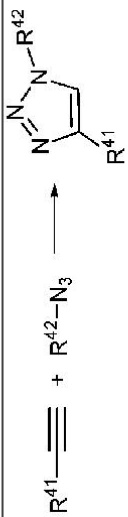
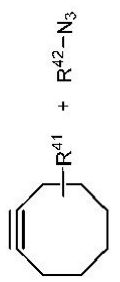
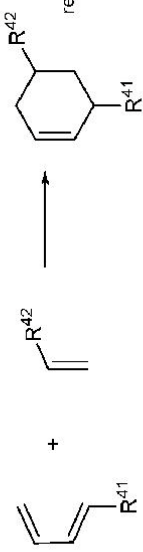
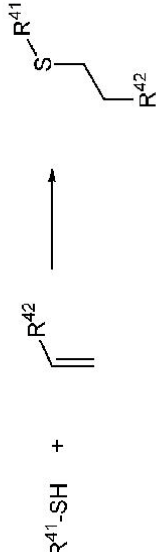
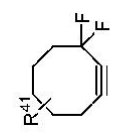
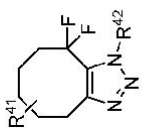
La expresión "agente de unión", como se usa aquí, se refiere a cualquier molécula que se une a otra molécula con alta afinidad. Un agente de unión puede unirse a su pareja de unión con alta especificidad. Los ejemplos de agentes de unión incluyen, sin limitación, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, moléculas de ácido nucleico, receptores, ligandos, aptámeros, y adnectinas.

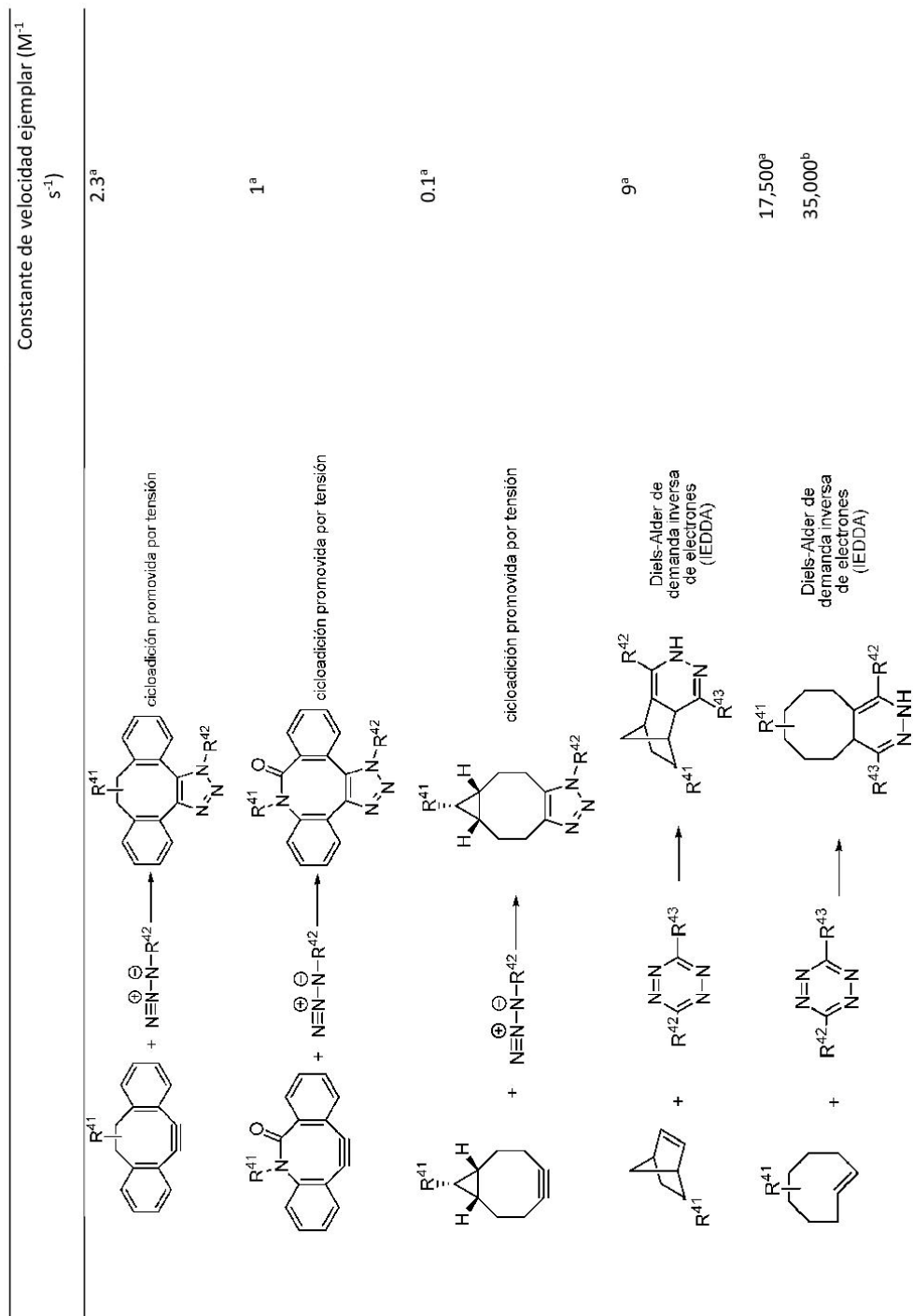
- 60 La expresión "química de clic" se refiere a una filosofía química introducida por K. Barry Sharpless del The Scripps Research Institute, que describe la química diseñada para generar enlaces covalentes de forma rápida y fiable al unir juntas pequeñas unidades que comprenden grupos reactivos (véase H. C. Kolb, M. G. Finn y K. B. Sharpless (2001). *Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions*. Angewandte Chemie International Edition

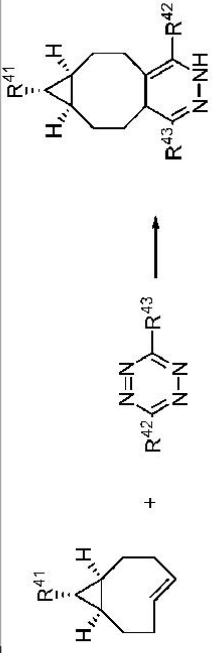
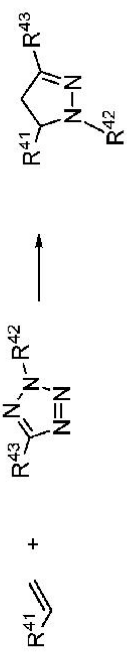
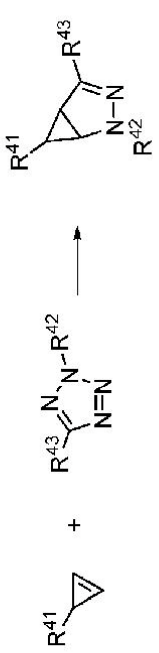
40 (11): 2004-2021. La química de clic no se refiere a una reacción específica, sino a un concepto que incluye, pero no se limita a, reacciones que imitan las reacciones que se encuentran en la naturaleza. Las reacciones de química de clic pueden ser modulares, de amplio alcance, dar altos rendimientos químicos, generar subproductos inofensivos, ser estereoespecíficas, exhibir una gran fuerza impulsora termodinámica para favorecer una reacción con un solo producto de reacción, y/o pueden llevarse a cabo en condiciones fisiológicas. Una reacción de química de clic puede exhibir una alta economía atómica, puede llevarse a cabo en condiciones de reacción simples, usar materiales de partida y reactivos fácilmente disponibles, no usar disolventes tóxicos o usar un disolvente que sea benigno o fácil de eliminar (preferiblemente agua), y/o proporcionar aislamiento simple del producto por métodos no cromatográficos (cristalización o destilación). La reacción de química de clic puede ser una cicloadición dipolar [2+3]. La reacción de química de clic puede ser una cicloadición de Diels-Alder.

La expresión “asa de química de clic”, como se usa aquí, se refiere a un agente reaccionante, o un grupo reactivo, que puede participar en una reacción de química de clic. Las asas de química de clic ejemplares se muestran en publicación de patente U.S. 20130266512. Por ejemplo, un alquino tenso, por ejemplo un ciclooctino, es un asa de química de clic, ya que puede participar en una cicloadición promovida por tensión (véase, por ejemplo, Tabla 1). En general, las reacciones de química de clic requieren al menos dos moléculas que comprenden asas de química de clic que pueden reaccionar entre sí. Dichos pares de asas de química de clic que son reactivos entre sí se denominan a veces aquí asas compañeras de química de clic. Por ejemplo, una azida es un asa de química de clic pareja de un ciclooctino o de cualquier otro alquino. Las asas de química de clic ejemplares adecuadas para su uso de acuerdo con algunos aspectos de esta descripción se describen aquí, por ejemplo en las Tablas 1 y 2. Las parejas de química de clic pueden ser un dieno conjugado y un alqueno opcionalmente sustituido. Las parejas de química de clic pueden ser una tetrazina opcionalmente sustituida y un trans-cicloocteno (TCO) opcionalmente sustituido. Las parejas de química de clic pueden ser tetrazina (Tz) opcionalmente sustituida y trans-cicloocteno (TCO) opcionalmente sustituido. Tz y TCO reaccionan entre sí en una reacción de cicloadición de Diels-Alder de demanda inversa de electrones (véase, por ejemplo, Ejemplo 2, Figura 4; Blackman et al., “The Tetrazina Ligation: Fast Bioconjugation based on Inverse-electron-demand Diels-Alder Reactivity.” J. Am. Chem. Soc. 2008; 130, 13518-13519). Las parejas de química de clic pueden ser un alquino opcionalmente sustituido y una azida opcionalmente sustituida. Por ejemplo, un ciclooctino difluorado, un dibenzociclooctino, una biarilazaciclooctinona, o un biciclononino condensado con ciclopropilo se pueden emparejar con una azida como una pareja de química de clic. Las parejas de química de clic pueden ser dienos reactivos y dienófilos de tetrazina adecuados. Por ejemplo, TCO, norborneno, o bisciclononeno se pueden emparejar con un dienófilo de tetrazina adecuado como una pareja de química de clic. Los tetrazoles pueden actuar como fuentes latentes de iminas de nitrilo, que pueden emparejarse con alquenos no activados en presencia de luz ultravioleta para crear una pareja de química de clic, denominado un par de química de “foto-clic”. La pareja de química de clic también puede ser una cisteína y una maleimida. Por ejemplo, la cisteína de un péptido (por ejemplo, GGGC (SEQ ID NO: 12)) puede reaccionar con una maleimida que está asociada con un agente quelante (por ejemplo, NOTA). Los expertos en la técnica conocen otras asas de química de clic adecuadas (véase, por ejemplo, Tabla 1; Spicer et al., “Selective chemical protein modification.” Nature Communications. 2014; 5:4740). Para que dos moléculas se conjuguen a través de la química de clic, las asas de química de clic de las moléculas deben ser reactivas entre sí, por ejemplo en el sentido de que el resto reactivo de una de las asas de química de clic puede reaccionar con el resto reactivo de la segunda asa de química de clic para formar un enlace covalente. Dichos pares reactivos de asas de química de clic son bien conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la Tabla 1.

Tabla 1: Asas y reacciones de química de clic ejemplares.

|                                                                                                                                |                                                                                                                                  | Constante de velocidad ejemplar ( $M^{-1} s^{-1}$ ) |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| $R^{41}-C\equiv C-C\equiv C + R^{42}-N_3 \longrightarrow$                                                                      |  <p>cicloaddición 1,3-dipolar</p>             | $1 \times 10^3$ <sup>a</sup>                        |
|  $+ R^{42}-N_3 \longrightarrow$             |  <p>reacción de Diels-Alder</p>               |                                                     |
| $R^{41}-SH + R^{42}-CH=CH_2 \longrightarrow$                                                                                   |  <p>reacción de tio-eno</p>                  |                                                     |
|  $+ N\equiv N-N^+-R^{42} \longrightarrow$ |  <p>cicloaddición promovida por tensión</p> | $8 \times 10^{-2}$ <sup>a</sup>                     |



| Constante de velocidad ejemplar (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )                  |                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| >50,000 <sup>a</sup> 880 <sup>b</sup>                                               |                                                             |
|  | <p>Diels-Alder de demanda inversa de electrones (IEDDA)</p> |
|  | <p>cicloaddición 1,3-dipolar ("foto-click")</p>             |
|  | <p>cicloaddición 1,3-dipolar ("foto-click")</p>             |

0.9<sup>a</sup>

58<sup>a</sup>

- 5 Cada uno de R<sup>41</sup>, R<sup>42</sup> y R<sup>43</sup> es independientemente hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclilo opcionalmente sustituido. Al menos uno de R<sup>41</sup>, R<sup>42</sup> y R<sup>43</sup> puede comprender independientemente un motivo de reconocimiento de sortasa. Uno de R<sup>41</sup>, R<sup>42</sup> y R<sup>43</sup> puede comprender independientemente un motivo de reconocimiento de sortasa. Dos de R<sup>41</sup>, R<sup>42</sup> y R<sup>43</sup> pueden comprender independientemente un motivo de reconocimiento de sortasa. Cada uno de R<sup>41</sup>, R<sup>42</sup> y R<sup>43</sup> puede comprender independientemente un motivo de reconocimiento de sortasa. Al menos uno de R<sup>41</sup>, R<sup>42</sup> y R<sup>43</sup> puede ser independientemente R<sub>R</sub>-LPXT-[X]<sub>y</sub>- (SEQ ID NO: 22), en el que cada aparición de X representa independientemente cualquier resto de aminoácido; cada aparición de y es un número entero entre 0 y 10, inclusive; y cada aparición de R<sub>R</sub> representa independientemente una proteína o un agente (por ejemplo, una proteína, un péptido, un marcador detectable, un agente de unión, una molécula pequeña), y, opcionalmente, un enlazador.
- 10 Cada aparición de R<sub>3</sub> es independientemente H, alquilo sustituido o no sustituido (por ejemplo, -CH<sub>3</sub>), o arilo sustituido o no sustituido.

<sup>a</sup>Constante de velocidad ejemplar para modelos de moléculas pequeñas.

<sup>b</sup>Constante de velocidad *on* ejemplar de la proteína.

- 15 Las asas de química de clic utilizadas pueden reaccionar para formar enlaces covalentes en ausencia de un catalizador metálico. Tales asas de química de clic son bien conocidas por los expertos en la técnica, e incluyen las asas de química de clic descritas en Becer, Hoogenboom, y Schubert (Tabla 2), "Click Chemistry beyond Metal-Catalyzed Cycloaddition," Angewandte Chemie International Edition (2009) 48: 4900 - 4908:

Tabla 2: Reacciones ejemplares de química de clic.

|    | Reactivo A | Reactivo B                       | Mecanismo                                                         | Notas sobre la reacción <sup>[a]</sup>                                      |
|----|------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| 0  | azida      | alquino                          | Cicloadición [3+2] de azida-alquino catalizada por Cu (CuAAC)     | 2 h a 60°C en H <sub>2</sub> O                                              |
| 1  | azida      | ciclooctino                      | Cicloadición [3+2] de azida-alquino promovida por tensión (SPAAC) | 1 h a RT                                                                    |
| 2  | azida      | alquino activado                 | Cicloadición [3+2] de Huisgen                                     | 4 h a 50°C                                                                  |
| 3  | azida      | alquino deficiente en electrones | Cicloadición [3+2]                                                | 12 h a RT en H <sub>2</sub> O                                               |
| 4  | azida      | arino                            | Cicloadición [3+2]                                                | 4 h a RT en THF con éter corona, o 24 h a RT en CH <sub>3</sub> CN          |
| 5  | tetrazina  | alqueno                          | Retro-cicloadición [4+2] de Diels-Alder                           | 40 min a 25°C (100% de rendimiento); N <sub>2</sub> es el único subproducto |
| 6  | tetrazol   | alqueno                          | Cicloadición 1,3-dipolar (fotoclic)                               | unos minutos de irradiación UV, y después toda la noche a 4°C               |
| 7  | ditioéster | dieno                            | Hetero-cicloadición de Diels-Alder                                | 10 min a RT                                                                 |
| 8  | antraceno  | maleimida                        | Reacción [4+2] de Diels-Alder                                     | 2 días a reflujo en tolueno                                                 |
| 9  | tiol       | alqueno                          | adición radicalica (tio-clic)                                     | 30 min UV (conv. cuantitativa), o 24 h de radiación UV (> 96%)              |
| 10 | tiol       | enona                            | Adición de Michael                                                | 24 h a RT en CH <sub>3</sub> CN                                             |
| 11 | tiol       | maleimida                        | Adición de Michael                                                | 1 h a 40°C en THF, o 16 h a RT en dioxano                                   |
| 12 | tiol       | <i>para</i> -fluoro              | sustitución nucleófila                                            | toda la noche a RT en DMF, o 60 min a 40°C en DMF                           |

|    |       |             |                        |                                            |
|----|-------|-------------|------------------------|--------------------------------------------|
| 13 | amina | Para-fluoro | sustitución nucleófila | 20 min MW a 95°C en NMP<br>como disolvente |
|----|-------|-------------|------------------------|--------------------------------------------|

---

[a] RT = temperatura ambiente, DMF = *N,N*-dimetilformamida, NMP=*N*-metilpirrolidona, THF=tetrahidrofurano, CH<sub>3</sub>CN=acetonitrilo.

---

Se conocen métodos y composiciones para usar la química de clic en combinación con tecnologías de clasificación, e incluyen los descritos por Ploegh et al., solicitud PCT internacional, PCT/US2012/044584, presentada el 28 de junio de 2012, publicada como WO 2013/003555 el 3 de enero de 2013; y Ploegh et al., solicitud de parente U.S., U.S.S.N. 13/918.278, presentada el 14 de junio de 2013.

El término "conjugado" o "conjugación" se refiere a una asociación de dos moléculas, por ejemplo dos proteínas, o una proteína y un agente, por ejemplo una molécula pequeña, entre sí de tal manera que están unidas por una interacción covalente o no covalente directa o indirecta. La asociación puede ser covalente, y se dice que las entidades están "conjugadas" entre sí. Una proteína se puede conjugar post-traduccionally con otra molécula, por ejemplo una segunda proteína, una molécula pequeña, un marcador detectable, un asa de química de clic, o un agente de unión, mediante la formación de un enlace covalente entre la proteína y la otra molécula después de que se ha formado la proteína, y después de que se ha aislado la proteína. Dos moléculas se pueden conjugar a través de un enlazador que conecta ambas moléculas. Por ejemplo, cuando dos proteínas pueden conjugarse entre sí para formar una fusión de proteínas, las dos proteínas pueden conjugarse a través de un enlazador polipeptídico, por ejemplo una secuencia de aminoácidos que conecta el extremo C de una proteína con el extremo N de la otra proteína. Dos proteínas se pueden conjugar en sus extremos C respectivos, generando una proteína quimérica conjugada C-C. Dos proteínas se pueden conjugar en sus respectivos extremos N, generando una proteína quimérica conjugada N-N. La conjugación de una proteína con un péptido puede lograrse mediante transpeptidación usando una sortasa. Véanse, por ejemplo, Ploegh et al., Solicitud de Patente PCT Internacional, PCT/US2010/000274, presentada el 1 de febrero de 2010, publicada como WO/2010/087994 el 5 de agosto de 2010, y Ploegh et al., Solicitud de Patente Internacional, PCT/US2011/033303, presentada el 20 de abril de 2011, publicada como WO/2011/133704 el 27 de octubre de 2011, para ejemplos de sortasas, proteínas, motivos de reconocimiento, reactivos, y métodos para la transpeptidación mediada por sortasa. La conjugación de una proteína a un péptido u otro resto puede lograrse usando otras enzimas conocidas en la técnica, por ejemplo enzima generadora de formilglutamina, sialiltransferasa, fosfopanteteiniltransferasa, transglutaminasa, farnesiltransferasa, biotina ligasa, ácido lipoico ligasa, o *N*-mirstoil transferasa. Se pueden encontrar técnicas y enfoques ejemplares para el marcaje enzimático de proteínas en Rashidian, M., et al. "Enzymatic Labeling of Proteins: Techniques and Approaches", Bioconjugate Chem., 2013; 24, 1277-1294.

Como se usa aquí, un "marcador detectable" se refiere a un resto que tiene al menos un elemento, isótopo o grupo funcional incorporado en el resto, que permite la detección de la molécula, por ejemplo una proteína o polipéptido, u otra entidad, a la que se une el marcador. Los marcadores se pueden unir directamente (es decir, a través de un enlace), o se pueden unir por una unión (tal como, por ejemplo, un alquileo opcionalmente sustituido; un alquilenilo opcionalmente sustituido; un alquilenilo opcionalmente sustituido; un heteroalquileo opcionalmente sustituido; un heteroalquilenilo opcionalmente sustituido; un heteroalquilenilo opcionalmente sustituido; un arileno sustituido, un heteroarileno opcionalmente sustituido, o un acileno opcionalmente sustituido, o cualquier combinación de los mismos, que puede formar una unión). Se apreciará que el marcador puede unirse o incorporarse a una molécula, por ejemplo una proteína, polipéptido u otra entidad, en cualquier posición.

En general, un marcador puede pertenecer a una (o más) de cinco clases: a) un marcador que contiene restos isotópicos, que pueden ser isótopos radiactivos o pesados, incluyendo, pero sin limitarse a, <sup>2</sup>H, <sup>3</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>18</sup>F, <sup>31</sup>P, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>67</sup>Ga, <sup>76</sup>Br, <sup>99m</sup>Tc (Tc-99m), <sup>111</sup>In, <sup>123</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>153</sup>Gd, <sup>169</sup>Yb, y <sup>186</sup>Re; b) un marcador que contiene un resto inmunitario, que puede ser anticuerpos o antígenos, que puede unirse a enzimas (por ejemplo, tal como peroxidasa de rábano picante); c) un marcador que es un resto coloreado, luminiscente, fosforescente, o fluorescente (por ejemplo, tal como el marcador fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC)); d) un marcador que tiene uno o más restos de fotoafinidad; y e) un marcador que es un ligando para una o más parejas de unión conocidas (por ejemplo, biotina-estreptavidina, FK506-FKBP). Un marcador puede comprender un isótopo radiactivo, preferiblemente un isótopo que emita partículas detectables, tal como partículas β. El marcador puede comprender un resto fluorescente. El marcador puede comprender un fluoróforo. El marcador puede ser el marcador fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC). El marcador puede comprender un resto de ligando con uno o más parejas de unión conocidas. El marcador puede comprender biotina. Un marcador puede ser un polipéptido fluorescente (por ejemplo, GFP o un derivado de la misma, tal como GFP mejorado (EGFP)), o una luciferasa (por ejemplo, una luciferasa de luciérnaga, Renilla, o Gaussia). Se apreciará que un marcador puede reaccionar con un sustrato adecuado (por ejemplo, una luciferina) para generar una señal detectable. Los ejemplos no limitativos de proteínas fluorescentes incluyen GFP y derivados de la misma, proteínas que comprenden cromóforos que emiten luz de diferentes colores, tales como proteínas fluorescentes rojas, amarillas y cian, etc. Ejemplos de proteínas fluorescentes incluyen, por ejemplo, Sirius, Azurite, EBFP2, TagBFP, mTurquoise, ECFP, Cerulean, TagCFP, mTFP1, mUkG1, mAGI, AcGFP1, TagGFP2, EGFP, mWasabi, EmGFP, TagYFP, EYFP, Topaz, SYFP2, Venus, Citrine, mKO, mKO2, mOrange, mOrange2, TagRFP, TagRFP-T, mStrawberry, mRuby, mCherry, mRaspberry, mKate2, mPlum, mNeptune, T-Sapphire, mAmetrine, mKeima. Véanse, por ejemplo, Chalfie, M. y Kain, SR (eds.) Green fluorescent protein: properties, applications, and

protocols (Methods of biochemical analysis, v. 47). Wiley-Interscience, Hoboken, N.J., 2006, y/o Chudakov, DM, et al., Physiol Rev. 90(3): 1103-63, 2010, para la discusión de GFP y muchas otras proteínas fluorescentes o luminiscentes. Un marcador puede comprender un extintor oscuro, por ejemplo una sustancia que absorbe la energía de excitación de un fluoróforo y disipa la energía en forma de calor.

- 5 Cualquiera de los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de dominio único) proporcionados aquí pueden comprender un radionucleido. El radionucleido puede ser  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (Tc-99m),  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{153}\text{Gd}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{169}\text{Yb}$ ,  $^{82}\text{Rb}$ , o  $^{186}\text{Re}$ . Sin embargo, el radionucleido puede no ser  $^{18}\text{F}$ . El radionucleido puede no ser  $^{89}\text{Zr}$ .

- 10 El término "enlazador", como se usa aquí, se refiere a un grupo químico o molécula unida covalentemente a una molécula, por ejemplo una proteína, y un grupo químico o resto, por ejemplo un asa de química de clic. El enlazador puede colocarse entre, o puede estar flanqueado por, dos grupos, moléculas, o restos, y puede conectarse a cada uno mediante un enlace covalente, conectando así los dos. El enlazador puede comprender uno o más átomos. El enlazador puede comprender entre 1 y 500 átomos. El enlazador puede comprender entre 1 y 10, 1 y 15, 1 y 20, 1 y 50, 1 y 100, 1 y 150, 1 y 200, 1 y 250, 1 y 300, 1 y 350, 1 y 400, y 1 y 450 átomos. El enlazador puede ser un aminoácido o una pluralidad de aminoácidos. El enlazador puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más de 20 aminoácidos. El enlazador puede comprender una secuencia de poliglicina. El enlazador puede comprender una estructura no proteica. El enlazador puede ser una molécula orgánica, un grupo, un polímero, o un resto químico (por ejemplo, polietileno, polietilenglicol).

- 20 El término "sortasa", como se usa aquí, se refiere a una enzima capaz de llevar a cabo una reacción de transpeptidación que conjuga mediante transamidación el extremo C de una proteína o péptido con el extremo N de una proteína o péptido. Las sortasas también se denominan transamidasas, y normalmente exhiben actividad tanto de proteasa como de transpeptidación. Se han identificado diversas sortasas de organismos procariontes. Por ejemplo, algunas sortasas de bacterias grampositivas escinden y translocan proteínas a restos de proteoglicano en paredes celulares intactas. Entre las sortasas que se han aislado de *Staphylococcus aureus*, están la sortasa A (Srt A) y la  
25 sortasa B (Srt B). Por lo tanto, una transamidasa usada según la presente descripción puede ser sortasa A, por ejemplo de *S. aureus*, también denominada aquí como SrtA<sub>aureus</sub>. Una transamidasa puede ser una sortasa B, por ejemplo de *S. aureus*, también denominada aquí como SrtB<sub>aureus</sub>.

- 30 Las sortasas se han clasificado en cuatro clases, designadas A, B, C y D, denominadas sortasa A, sortasa B, sortasa C y sortasa D, respectivamente, según la alineación de secuencias y el análisis filogenético de 61 sortasas de genomas de bacterias grampositivas. (Dramsí S, Trieu-Cuot P, Bierne H, Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria. Res Microbiol.156(3):289-97, 2005). Estas clases corresponden a las siguientes subfamilias, en las que también Comfort y Clubb han clasificado las sortasas (Comfort D, Clubb RT. "A comparative genome analysis identifies distinct sorting pathways in gram-positive bacteria" Infect Immun., 72(5):2710-22, 2004): Clase A (Subfamilia 1), Clase B (Subfamilia 2), Clase C (Subfamilia 3), Clase D (Subfamilias 4 y 5). Las referencias antes mencionadas describen numerosas sortasas y motivos de reconocimiento. Véase también, Pallen, M. J.; Lam, A. C.; Antonio, M.; Dunbar, K. TRENDS in Microbiology, 2001, 9(3), 97-101. Los expertos en la técnica podrán asignar fácilmente una sortasa a la clase correcta en función de su secuencia y/u otras características, tales como las descritas en Drams, *et al.*, más arriba.

- 40 El término "sortasa A" se usa aquí para referirse a una sortasa de clase A, generalmente denominada SrtA en cualquier especie bacteriana en particular, por ejemplo SrtA de *S. aureus*. Del mismo modo, "sortasa B" se usa aquí para referirse a una sortasa de clase B, generalmente denominada SrtB en cualquier especie bacteriana en particular, por ejemplo SrtB de *S. aureus*. La descripción abarca una sortasa A de cualquier especie o cepa bacteriana. La descripción abarca una sortasa B de cualquier especie o cepa bacteriana. La descripción abarca una sortasa de clase C de cualquier especie o cepa bacteriana. La descripción abarca una sortasa de clase D de cualquier especie o cepa  
45 bacteriana.

- Las secuencias de aminoácidos de Srt A y Srt B y las secuencias nucleotídicas que las codifican son conocidas por los expertos en la técnica, y se describen en varias referencias citadas aquí. La secuencia de aminoácidos de una sortasa-transamidasa de *Staphylococcus aureus* también tiene una homología sustancial con secuencias de enzimas de otras bacterias grampositivas, y dichas transamidasas pueden utilizarse en los procesos de ligación descritos aquí. Por ejemplo, para SrtA hay alrededor de un 31 % de identidad de secuencia (y alrededor de 44 % de similitud de secuencia) con la mejor alineación en toda la región secuenciada del marco de lectura abierto de *S. pyogenes*. Hay alrededor de un 28% de identidad de secuencia con la mejor alineación en toda la región secuenciada del marco de lectura abierto de *A. naeslundii*. Se apreciará que diferentes cepas bacterianas pueden exhibir diferencias en la secuencia de un polipéptido particular, y las secuencias aquí son ejemplares.

- 55 Se puede seleccionar una transamidasa que tiene 18% o más de identidad de secuencia, 20% o más de identidad de secuencia, 30% o más de identidad de secuencia, 40% o más de identidad de secuencia, o 50% o más de identidad de secuencia con un marco de lectura abierto de *S. pyogenes*, *A. naeslundii*, *S. mutans*, *E. faecalis* o *B. subtilis* que codifica una sortasa, y se puede utilizar las enzimas que tienen una actividad de transamidasa comparable a Srt A o Srt B de *S. aureus* (por ejemplo, la actividad comparable es algunas veces el 10% de la actividad de Srt A o Srt B o más).  
60

Así, la sortasa puede ser una sortasa A (SrtA). SrtA reconoce el motivo (por ejemplo, el motivo de reconocimiento de sortasa) LPXTX (en el que cada aparición de X representa independientemente cualquier resto de aminoácido) (SEQ ID NO: 15), siendo los motivos de reconocimiento comunes, por ejemplo, LPKGTG (SEQ ID NO: 23), LPATG (SEQ ID NO: 24), LPNTG (SEQ ID NO: 25). Puede usarse LPETG (SEQ ID NO: 11) como motivo de reconocimiento de sortasa.

Sin embargo, también pueden reconocerse motivos que quedan fuera de este consenso. Por ejemplo, el motivo puede comprender una 'A' en lugar de una 'T' en la posición 4, por ejemplo LPXAG (SEQ ID NO: 17), por ejemplo LPNAG (SEQ ID NO: 26). El motivo comprende una 'A' en lugar de una 'G' en la posición 5, por ejemplo LPXTA (SEQ ID NO: 27), por ejemplo LPNTA (SEQ ID NO: 28), por ejemplo LPETA (SEQ ID NO: 29). El motivo puede comprender una 'G' en lugar de una 'P' en la posición 2, por ejemplo LGXTG (SEQ ID NO: 30), por ejemplo LGATG (SEQ ID NO: 31). El motivo puede comprender una 'I' en lugar de una 'L' en la posición 1, por ejemplo IPXTG (SEQ ID NO: 32), por ejemplo IPNTG (SEQ ID NO: 33) o IPETG (SEQ ID NO: 34). Los motivos de reconocimiento de sortasa adecuados adicionales serán evidentes para los expertos en la técnica, y la descripción no se limita a este respecto. Se apreciará que las expresiones "motivo de reconocimiento" y "secuencia de reconocimiento", con respecto a las secuencias reconocidas por una transamidasa o sortasa, se usan indistintamente.

La sortasa puede ser una sortasa B (SrtB), por ejemplo una sortasa B de *S. aureus*, *B. anthracis*, o *L. monocytogenes*. Los motivos reconocidos por sortasas (motivos de reconocimiento de sortasas) de la clase B (SrtB) caen a menudo dentro de las secuencias de consenso NPXTX (SEQ ID NO: 16), por ejemplo NP[Q/K]-[T/s]-[N/G/s] (SEQ ID NO: 35), tal como NPQTN (SEQ ID NO: 36) o NPKTG (SEQ ID NO: 37). Por ejemplo, la sortasa B de *S. aureus* o *B. anthracis* escinde el motivo NPQTN (SEQ ID NO: 36) o NPKTG (SEQ ID NO: 37) de IsdC en las bacterias respectivas (véase, por ejemplo, Marraffini, L. y Schneewind, O., Journal of Bacteriology, 189(17), p. 6425-6436, 2007). Otros motivos de reconocimiento encontrados en supuestos sustratos de sortasas de clase B son NSKTA (SEQ ID NO: 38), NPQTG (SEQ ID NO: 39), NAKTN (SEQ ID NO: 40) y NPQSS (SEQ ID NO: 41). Por ejemplo, SrtB de *L. monocytogenes* reconoce ciertos motivos que carecen de P en la posición 2 y/o que carecen de Q o K en la posición 3, tal como NAKTN (SEQ ID NO: 40) y NPQSS (SEQ ID NO: 41) (Mariscotti JF, García-Del Portillo F, Pucciarelli MG. The listeria monocytogenes sortase-B recognizes varied amino acids at position two of the sorting motif. J Biol Chem. 7 de enero de 2009.)

La sortasa puede ser una sortasa C (SrtC). La sortasa C puede utilizar LPXTX (SEQ ID NO: 15) como un motivo de reconocimiento, representando cada aparición de X independientemente cualquier resto de aminoácido.

La sortasa puede ser una sortasa D (SrtD). Se prevé que las sortasas de esta clase reconozcan motivos con una secuencia consenso NA-[E/A/S/H]-TG (SEQ ID NO: 42) (Comfort D, más arriba). La sortasa D se ha encontrado, por ejemplo, en *Streptomyces spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Tropheryma whipplei*, *Thermobifida fusca*, y *Bifidobacterium longum*. LPXTA (SEQ ID NO: 43) o LAXTG (SEQ ID NO: 44) pueden servir como secuencia de reconocimiento para la sortasa D, por ejemplo de las subfamilias 4 y 5, respectivamente, las enzimas de la subfamilia 4 y la subfamilia 5 procesan los motivos LPXTA (SEQ ID NO: 27) y LAXTG (SEQ ID NO: 44), respectivamente). Por ejemplo, se ha mostrado que la sortasa C de *B. anthracis* escinde específicamente el motivo LPNTA (SEQ ID NO: 28) en *B. anthracis* BasI y BasH (véase Marraffini, más arriba).

Véase Barnett y Scott para obtener una descripción de una sortasa que reconoce el motivo QVPTGV (SEQ ID NO: 45) (Barnett, TC y Scott, JR, Differential Recognition of Surface Proteins in Streptococcus pyogenes by Two Sortase Gene Homologs. Journal of Bacteriology, vol. 184, núm. 8, pág. 2181-2191, 2002). Sortasas adicionales, incluyendo, pero sin limitarse a, sortasas y variantes de sortasa que reconocen motivos de reconocimiento de sortasa adicionales, también son adecuadas para uso en esta descripción. Por ejemplo, las sortasas descritas en Chen I. et al., "A general strategy for the evolution of bond-forming enzymes using yeast display.", Proc Natl Acad Sci USA. 12 de julio de 2011; 108 (28):11399; Dorr, B. M., et al., "Reprogramming the specificity of sortase enzymes". Proc Natl Acad Sci USA. 2014, 111, 13343-13348.

Puede usarse una variante de una sortasa de origen natural. Dichas variantes se pueden producir a través de procesos tales como la evolución dirigida, la modificación específica del sitio, etc. Hay disponible una cantidad considerable de información estructural sobre las enzimas sortasa, por ejemplo las enzimas sortasa A, incluyendo RMN o las estructuras cristalinas de SrtA, sola o unida a una secuencia de reconocimiento de sortasa (véase, por ejemplo, Zong Y, et al. J. Biol Chem. 2004, 279, 31383-31389). La información de la estructura tridimensional también está disponible para otras sortasas, por ejemplo SrtA de *S. pyogenes* (Race, PR y col., J Biol Chem. 2009, 284(11):6924-33). Se han identificado el sitio activo y el bolsillo de unión al sustrato de SrtA de *S. aureus*. Un experto normal en la técnica puede generar variantes funcionales, por ejemplo, evitando delecciones o sustituciones que interrumpirían o alterarían sustancialmente el sitio activo o el bolsillo de unión al sustrato de una sortasa. Una variante funcional de SrtA de *S. aureus* puede comprender His en la posición 120, Cys en la posición 184, y Arg en la posición 197, en la que Cys en la posición 184 está ubicada dentro de un motivo TLXTC (SEQ ID NO: 46). Las variantes funcionales de otras proteínas SrtA pueden tener motivos His, Cys, Arg y TLXTC (SEQ ID NO: 46) en posiciones que corresponden a las posiciones de estos restos en SrtA de *S. aureus*. Una variante de sortasa puede comprender una secuencia al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de sortasa A de tipo salvaje o dominio catalítico de la misma, por ejemplo al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a los aminoácidos 60-206 de SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 48, o al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a los aminoácidos 26-206 de SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 48. Una variante de sortasa puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 sustituciones de aminoácidos

con respecto a los aminoácidos 60 - 206 de SEQ ID NO: 47, o con respecto a los aminoácidos 26 - 206 de SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 48.

Se puede usar una transamidasa que tenga una actividad de transamidasa superior a la de una sortasa de origen natural. La actividad de la transamidasa puede ser al menos alrededor de 10, 15, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, o 200 veces tan alta como la de sortasa A de *S. aureus*. La actividad puede ser entre alrededor de 10 y 50 veces tan alta como la de la sortasa A de *S. aureus*, por ejemplo entre alrededor de 10 y 20 veces tan alta, entre alrededor de 20 y 30 veces tan alta, entre alrededor de 30 y 50 veces tan alta. La actividad puede ser entre alrededor de 50 y 150 veces tan alta como la de la sortasa A de *S. aureus*, por ejemplo entre alrededor de 50 y 75 veces tan alta, entre alrededor de 75 y 100 veces tan alta, entre alrededor de 100 - 125 veces tan alta, o entre alrededor de 125 y 150 veces tan alta. Por ejemplo, se han identificado variantes de sortasa A de *S. aureus* con un aumento de hasta 140 veces en la actividad de acoplamiento a LPETG (SEQ ID NO: 11) en comparación con la enzima de tipo salvaje de partida (Chen, I., et al., PNAS 108(28): 11399-11404, 2011). Tal variante de sortasa puede usarse en una composición de la descripción. Una variante de sortasa puede comprender una cualquiera o más de las siguientes sustituciones con respecto a una SrtA de *S. aureus* de tipo salvaje: mutaciones P94S o P94R, D160N, D165A, K190E y K196T.

Un experto en la técnica apreciará que las descripciones anteriores de sustituciones utilizan la notación estándar de la forma  $X_1NX_2$ , en la que  $X_1$  y  $X_2$  representan aminoácidos y N representa una posición de aminoácido,  $X_1$  representa un aminoácido presente en una primera secuencia (por ejemplo, una secuencia de SrtA de *S. aureus* de tipo salvaje), y  $X_2$  representa un aminoácido que se sustituye por  $X_1$  en la posición N, lo que da como resultado una segunda secuencia que tiene  $X_2$  en la posición N en lugar de  $X_1$ . Debe entenderse que la presente descripción no pretende limitarse de ninguna manera por la identidad del resto de aminoácido original  $X_1$  que está presente en una posición particular N en una secuencia de SrtA de tipo salvaje usada para generar una variante de SrtA y es reemplazado por  $X_2$  en la variante. Se contempla en la descripción cualquier sustitución que dé como resultado el resto de aminoácido especificado en una posición especificada aquí. Así, una sustitución puede definirse por la posición y la identidad de  $X_2$ , mientras que  $X_1$  puede variar dependiendo, por ejemplo, de la especie o cepa bacteriana particular de la que se origina una SrtA particular. Por lo tanto, una variante de sortasa A puede comprender uno o más de los siguientes: un resto S en la posición 94 (S94) o un resto R en la posición 94 (R94), un resto N en la posición 160 (N160), un resto A en la posición 165 (A165), un resto E en la posición 190 (E190), un resto T en la posición 196 (T196) (numerado según la numeración de una SrtA de tipo salvaje, por ejemplo SEQ ID NO: 47). Por ejemplo, una variante de sortasa A puede comprender dos, tres, cuatro o cinco de las mutaciones mencionadas anteriormente con respecto a una SrtA de *S. aureus* de tipo salvaje (por ejemplo, SEQ ID NO: 47). Una variante de sortasa A puede comprender un resto S en la posición 94 (S94) o un resto R en la posición 94 (R94), y también un resto N en la posición 160 (N160), un resto A en la posición 165 (A165), y un resto T en la posición 196 (T196). Por ejemplo, una variante de sortasa A puede comprender P94S o P94R, y también D160N, D165A, y K196T. Una variante de sortasa A puede comprender un resto S en la posición 94 (S94) o un resto R en la posición 94 (R94) y también un resto N en la posición 160 (N160), un resto A en la posición 165 (A165), un resto E en la posición 190, y un resto T en la posición 196. Por ejemplo, una variante de sortasa A puede comprender P94S o P94R, y también D160N, D165A, K190E, y K196T. Una variante de sortasa A puede comprender un resto R en la posición 94 (R94), un resto N en la posición 160 (N160), un resto A en la posición 165 (A165), un resto E en la posición 190, y un resto T en la posición 196. Una sortasa puede comprender P94R, D160N, D165A, K190E, y K196T.

Debe entenderse además que la descripción contempla variantes de cualquier sortasa A de tipo salvaje. Los expertos en la técnica apreciarán que las secuencias de tipo salvaje de la sortasa A pueden variar; por ejemplo, SrtA de diversas especies puede tener espacios vacíos, inserciones, y/o puede variar en longitud con respecto a la secuencia de aminoácidos de SrtA de *S. aureus* de tipo salvaje ejemplar. Los expertos en la técnica apreciarán que las posiciones descritas aquí con respecto a las sustituciones u otras alteraciones pertenecen a la secuencia de SrtA de *S. aureus* de tipo salvaje ejemplar, a menos que se indique lo contrario, y que dichas posiciones pueden ajustarse al realizar las sustituciones correspondientes en diferentes secuencias de SrtA bacterianas para tener en cuenta tales espacios, inserciones, y/o diferencias de longitud. Por ejemplo, como se indicó anteriormente, ciertas variantes de sortasa comprenden una sustitución en la posición 94 de aminoácido (por ejemplo, el aminoácido se cambia a un resto S). Sin embargo, el aminoácido en la posición 94 en SrtA de *S. aureus* puede corresponder a un aminoácido en una posición diferente (por ejemplo, la posición Z) en SrtA de una segunda especie bacteriana cuando se alinean las secuencias. Cuando se genera una variante de SrtA de la segunda especie bacteriana que comprende una sustitución en la "posición 94" (basada en la numeración de la secuencia de SrtA de *S. aureus* de tipo salvaje), es el aminoácido en la posición Z de la SrtA de la segunda especie bacteriana que debe cambiarse (por ejemplo, a S) en lugar del aminoácido en la posición 94. Los expertos en la técnica entenderán cómo alinear cualquier secuencia original de sortasa A de tipo salvaje que se usará para generar una variante de SrtA con una secuencia ejemplar de sortasa A de *S. aureus* de tipo salvaje con el fin de determinar las posiciones en la secuencia de sortasa A de tipo salvaje original que corresponde a la secuencia ejemplar de sortasa A de *S. aureus* de tipo salvaje cuando se tienen en cuenta espacios y/o inserciones en el alineamiento de las dos secuencias.

Los aminoácidos en las posiciones 94, 160, 165, 190 y/o 196 pueden alterarse en una variante en comparación con los aminoácidos presentes en esas posiciones en una SrtA de *S. aureus* de tipo salvaje, y los otros aminoácidos de la variante pueden ser idénticos a los presentes en las posiciones correspondientes en una SrtA de tipo salvaje, por ejemplo una SrtA de *S. aureus* de tipo salvaje. Uno o más de los otros aminoácidos de una variante, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los otros aminoácidos, pueden diferir de los presentes en la o las posiciones correspondientes

en una SrtA de tipo salvaje, por ejemplo una SrtA de *S. aureus* de tipo salvaje. Una variante puede tener cualquiera de las propiedades o grados de identidad de secuencia especificados en la definición de “variantes” anterior.

A continuación se muestra una secuencia ejemplar de SrtA de *S. aureus* de tipo salvaje (Gen ID: 1125243, NCBI RefSeq Acc. No. NP\_375640.1), con las posiciones mencionadas anteriormente subrayadas:

MKKWTNRLMTIAGVVLILVAAYLFAKPHIDNYLHDKDKDEKIEQYDKNVKEQASKDN  
KQQAQKQIPKDKSKVAGYIEIPDADIKEPVYPGPATPEQLNRGVSF AEENESLDDQNISIA  
GHTFIDRPNYQFTNLKAAKKGSMVYFKVGNETRKYKMTSIRDVKPTDVEVLDEQKGK

5 DKQLTLITCDDYNEKTGVWEKRRKIFVATEVK (SEQ ID NO: 47).

Un experto normal en la técnica apreciará que diferentes subespecies, cepas, y aislados pueden diferir en la secuencia en posiciones que no afectan significativamente a la actividad. Por ejemplo, otra secuencia ejemplar de SrtA *S. aureus* de tipo salvaje (Gene ID: 3238307, NCBI RefSeq Acc. No. YP\_187332.1; GenBank Acc. No. AAD48437) tiene un resto K en la posición 57 y un resto G en la posición 167, como se muestra a continuación en SEQ ID NO: 48:

MKKWTNRLMTIAGVVLILVAAYLFAKPHIDNYLHDKDKDEKIEQYDKNVKEQASKDK  
KQQAQKQIPKDKSKVAGYIEIPDADIKEPVYPGPATPEQLNRGVSF AEENESLDDQNISIA  
GHTFIDRPNYQFTNLKAAKKGSMVYFKVGNETRKYKMTSIRDVKPTDVGVLEDEQKGK

10 DKQLTLITCDDYNEKTGVWEKRRKIFVATEVK (SEQ ID NO: 48)

Cualquiera de estos aminoácidos, o ambos (por ejemplo, K57 y/o G167), pueden estar presentes o introducirse en cualquier secuencia de SrtA, por ejemplo cualquier secuencia de SrtA de *S. aureus*, ya sea natural o generada por el hombre. Además, como se describe aquí, cualquier secuencia de sortasa puede comprender además una etiqueta (por ejemplo, 6XHis), un espaciador, o ambos. Por ejemplo, el término N o C puede extenderse para abarcar una etiqueta, opcionalmente separada del resto de la secuencia por un espaciador,

Se puede usar una variante de sortasa que comprende la siguiente secuencia, en la que las sustituciones de aminoácidos con respecto a una SrtA de *S. aureus* de tipo salvaje de SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 48 se muestran en letras negritas subrayadas:

MQAKQPQIPKDKSKVAGYIEIPDADIKEPVYPGPATREQLNRGVSF AEENESLDDQNISIA  
GHTFIDRPNYQFTNLKAAKKGSMVYFKVGNETRKYKMTSIRNVKPTAVEVLDEQKGK  
DKQLTLITCDDYNEETGVWETRKIFVATEVK (SEQ ID NO: 49).

20 Como se apreciará, los aminoácidos 2-148 de la secuencia anterior corresponden a los aminoácidos 60-206 de la secuencia de SrtA de *S. aureus* de longitud completa (el dominio catalítico). Por ejemplo, el resto “R” en la posición 36 de SEQ ID NO: 49 corresponde al resto “P” en la posición 94 en SEQ ID NO: 47 o 48. También se contempla usar variantes de sortasa que tienen otras sustituciones en una o más de las posiciones 94, 160, 165, 190 y 196 (numeradas según la numeración de SEQ ID NO: 47 o 48), por ejemplo en las que tales sustituciones utilizan un aminoácido que sería una sustitución conservativa en la posición relevante en comparación con la secuencia de SEQ ID NO: 49.

En el contexto de esta descripción se contempla, el uso de sortasas que se encuentran en cualquier organismo grampositivo, tales como los mencionados aquí y/o en las referencias (incluyendo las bases de datos) citadas aquí. También se contempla el uso de sortasas que se encuentran en bacterias gramnegativas, por ejemplo *Colwellia psycherythraea*, *Microbulbifer degradans*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Shewanella oneidensis*, y *Shewanella putrefaciens*. Dichas sortasas reconocen motivos de secuencia fuera del consenso LPXTX (SEQ ID NO: 15), por ejemplo LP[Q/K]T[A/S]T (SEQ ID NO: 50). De acuerdo con la variación tolerada en la posición 3 en sortasas de organismos grampositivos, puede usarse un motivo de secuencia LPXT[A/S] (SEQ ID NO: 51), por ejemplo LPXTA (SEQ ID NO: 27) o LPSTS (SEQ ID NO: 52).

Los expertos en la técnica apreciarán que cualquier motivo de reconocimiento de sortasa conocido en la técnica se puede usar en esta descripción, y que la descripción no está limitada a este respecto. Por ejemplo, el motivo de reconocimiento de sortasa se puede seleccionar de: LPKTG (SEQ ID NO: 23), LPITG (SEQ ID NO: 53), LPDTA (SEQ ID NO: 54), SPKTG (SEQ ID NO: 55), LAETG (SEQ ID NO: 56), LAATG (SEQ ID NO: 57), LAHTG (SEQ ID NO: 58), LASTG (SEQ ID NO: 59), LPLTG (SEQ ID NO: 60), LSRTG (SEQ ID NO: 61), LPETG (SEQ ID NO: 61), VPDTG (SEQ ID NO: 62), IPQTG (SEQ ID NO: 63), YPRRG (SEQ ID NO: 64), LPMTG (SEQ ID NO: 65), LAFTG (SEQ ID NO: 66), LPQTS (SEQ ID NO: 67), entendiéndose que en la descripción el quinto resto puede ser reemplazado por cualquier otro resto de aminoácido. Por ejemplo, la secuencia usada puede ser LPXT (SEQ ID NO: 22), LAXT (SEQ ID NO: 68), LPXA (SEQ ID NO: 69), LGXT (SEQ ID NO: 70), IPXT (SEQ ID NO: 71), NPXT (SEQ ID NO: 72), NPQS (SEQ ID NO: 73), LPST (SEQ ID NO: 74), NSKT (SEQ ID NO: 75), NPQT (SEQ ID NO: 76), NAKT (SEQ ID NO: 77), LPIT (SEQ ID NO: 78), LAET (SEQ ID NO: 79), o NPQS (SEQ ID NO: 80). En la descripción, ‘X’ en cualquier motivo de

- reconocimiento de sortasa descrito aquí o conocido en la técnica puede ser un aminoácido, por ejemplo cualquier aminoácido de origen natural o no natural. X puede seleccionarse de los 20 aminoácidos estándar que se encuentran más comúnmente en las proteínas que se encuentran en los organismos vivos. Cuando el motivo de reconocimiento es LPXTG (SEQ ID NO: 81) o LPXT (SEQ ID NO: 22), X puede ser D, E, A, N, Q, K o R. X en un motivo de reconocimiento particular se puede seleccionar de aquellos aminoácidos que se encuentran de forma natural en la posición 3 en un sustrato de sortasa de origen natural. Por ejemplo, X se puede seleccionar de K, E, N, Q, A en un motivo LPXTG (SEQ ID NO: 81) o LPXT (SEQ ID NO: 22), en el que la sortasa es una sortasa A. X se puede seleccionar de K, S, E, L, A, N en un motivo LPXTG (SEQ ID NO: 81) o LPXT (SEQ ID NO: 22), y se usa una sortasa de clase C.
- Una secuencia de reconocimiento de sortasa puede comprender además uno o más aminoácidos adicionales, por ejemplo en el extremo N o C. Por ejemplo, se pueden incorporar uno o más aminoácidos (por ejemplo, hasta cinco aminoácidos) que tienen la identidad de los aminoácidos encontrados inmediatamente N-terminales a, o C-terminales a, una secuencia de reconocimiento de cinco aminoácidos en un sustrato de sortasa de origen natural. Dichos aminoácidos adicionales pueden proporcionar un contexto que mejore el reconocimiento del motivo de reconocimiento.
- La expresión “motivo de reconocimiento de sortasa”, como se usa aquí, se refiere a cualquier molécula que sea reconocida por una sortasa, por ejemplo cualquier molécula que pueda participar en una reacción de transpeptidación mediada por sortasa. “Motivo de reconocimiento de sortasa” y “secuencia de reconocimiento de sortasa” se pueden usar indistintamente. Una reacción de transpeptidación típica mediada por sortasa implica un sustrato que comprende un motivo de reconocimiento de sortasa C-terminal, por ejemplo un motivo LPXTX (SEQ ID NO: 15), y un segundo sustrato, denominado aquí “sustrato de sortasa”. Un sustrato de sortasa es un resto químico que puede participar en una reacción de transpeptidación mediada por sortasa con un motivo de reconocimiento de sortasa. El sustrato de sortasa puede ser una poliglicina o polialanina. El sustrato de sortasa puede comprender un grupo alquilamina. El sustrato sortasa puede ser N-terminal. El sustrato de sortasa puede ser C-terminal. Es posible que no se requiera que un sustrato de sortasa, o motivo de reconocimiento de sustrato, aunque descrito como “C-terminal” o “N-terminal”, esté en el extremo N o C inmediato. Por ejemplo, otros aminoácidos, por ejemplo una etiqueta (por ejemplo, una etiqueta 6xHis), se encuentran en el extremo C inmediato de una proteína que comprende un motivo de reconocimiento de sortasa C-terminal, y el motivo de reconocimiento de sortasa C-terminal es adyacente (por ejemplo, dentro de 5, 10, 15 o 20 aminoácidos) a ellos. Un motivo de reconocimiento de sortasa puede ser un péptido o una proteína, por ejemplo un péptido que comprende un motivo de reconocimiento de sortasa tal como LPXTX (SEQ ID NO: 15). Un sustrato de sortasa puede ser una poliglicina, una polialanina, o un grupo alquilamina, en el que el péptido está conjugado con un agente, por ejemplo un compuesto radiomarcado o una molécula pequeña. En consecuencia, tanto las proteínas como las moléculas no proteicas pueden ser sustratos de sortasa. Algunos ejemplos de sustratos de sortasa se describen con más detalle en otra parte aquí, y los sustratos de sortasa adecuados adicionales serán evidentes para el experto. La descripción no está limitada a este respecto.
- El término “sortaje”, como se usa aquí, se refiere al proceso de añadir una etiqueta o agente, por ejemplo un resto o molécula, por ejemplo un compuesto radiomarcado o una molécula pequeña, a una molécula diana, por ejemplo una proteína diana, para uso en aplicaciones de PET a través de una reacción de transpeptidación mediada por sortasa. Los ejemplos de etiquetas adecuadas adicionales incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos, ácidos nucleicos, polinucleótidos, azúcares, hidratos de carbono, polímeros, lípidos, ácidos grasos, y moléculas pequeñas. Otras etiquetas adecuadas serán evidentes para los expertos en la técnica, y la descripción no se limita a este aspecto. Una etiqueta puede comprender una secuencia útil para purificar, expresar, solubilizar, y/o detectar un polipéptido. Una etiqueta puede cumplir múltiples funciones. Una etiqueta comprende una etiqueta HA, TAP, Myc, 6xHis, Flag, estreptavidina, biotina, o GST, por citar algunos ejemplos. Una etiqueta puede ser escindible, de modo que se pueda eliminar, por ejemplo, por una proteasa. Esto se puede lograr incluyendo un sitio de escisión de proteasa en la etiqueta, por ejemplo adyacente o unido a una parte funcional de la etiqueta. Proteasas ejemplares incluyen, por ejemplo, trombina, proteasa TEV, Factor Xa, proteasa PreScission, etc. Se puede usar una etiqueta que se “autoescinde”. Véase, por ejemplo, Wood et al., Solicitud PCT Internacional PCT/US2005/05763, presentada el 24 de febrero de 2005 y publicada como WO/2005/086654 el 22 de septiembre de 2005.
- El término “sujeto” incluye, pero no se limita a, vertebrados, más específicamente un mamífero (por ejemplo, un ser humano, un caballo, un cerdo, un conejo, un perro, una oveja, una cabra, un primate no humano, una vaca, un gato, un conejillo de Indias, o un roedor), un pez, un ave, un reptil, o un anfibio. El sujeto puede ser un sujeto humano. Como se usa aquí, “paciente” se refiere a un sujeto afectado por una enfermedad o trastorno. El término “paciente” incluye sujetos humanos y veterinarios de cualquier sexo o etapa de desarrollo.
- La expresión “proteína diana”, como se usa aquí en el contexto de la modificación de proteínas mediada por sortasa, se refiere a una proteína que se modifica mediante la conjugación de un agente, por ejemplo un agente radiactivo que hace que la proteína sea adecuada para aplicaciones de diagnóstico y/o terapéuticas, tal como la formación de imágenes mediante PET. La expresión “proteína diana” puede referirse a una forma de tipo salvaje o de origen natural de la proteína respectiva, o a una forma manipulada, por ejemplo a una variante de proteína recombinante que comprende un motivo de reconocimiento de sortasa no contenido en una forma de tipo salvaje de la proteína. La expresión “modificar una proteína diana”, como se usa aquí en el contexto de la modificación de proteínas mediada por sortasa, se refiere a un proceso de alteración de una proteína diana que comprende un motivo de reconocimiento de sortasa a través de una reacción de transpeptidación mediada por sortasa. Normalmente, la modificación conduce

a que la proteína diana se conjugue con un agente, por ejemplo un péptido, una proteína, un marcador detectable, o una molécula pequeña. La modificación puede proporcionar proteínas radiomarcadas.

#### Anticuerpos y anticuerpos de dominio único

- 5 Algunos aspectos de la descripción proporcionan anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de dominio único) que comprenden un polímero hidrófilo y un marcador detectable. Otros aspectos de la descripción proporcionan métodos para conjugar polímeros hidrófilos y/o marcadores detectables a anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de dominio único). Dichos anticuerpos pueden ser útiles para obtener imágenes, por ejemplo de un tumor, un tejido o un órgano en un sujeto. Debe apreciarse que cualquiera de los anticuerpos proporcionados aquí puede unirse a un antígeno particular. Cualquiera de los anticuerpos proporcionados aquí puede producirse, por ejemplo, inmunizando a un sujeto (por ejemplo, animal de investigación) con un antígeno, o usando otros métodos, tal como la presentación en fagos. Se puede decir que un anticuerpo se une a un antígeno si es capaz de unirse a dicho antígeno con una afinidad mayor que  $10^{-6}$ M. Puede decirse que un anticuerpo se une a un antígeno si es capaz de unirse a dicho antígeno con una afinidad mayor que  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M, o  $10^{-11}$  M.
- 10
- 15 Cualquiera de los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de dominio único) proporcionados aquí pueden ser humanizados. Los métodos de humanización de anticuerpos son conocidos en la técnica, y serán evidentes para el experto. Se ha desarrollado tecnología para humanizar los VHH de camélidos (véase, por ejemplo, Vincke et al., J. Biol. Chem. 2009, 284, 3273-3284), y ya se han usado varios VHH en una serie de ensayos clínicos de fase I y fase II para aplicaciones terapéuticas (véase, por ejemplo, De Meyer et al., Trends Biotechnol. 2014, 32, 263-270). Los métodos para usar los VHH (por ejemplo, cualquiera de los VHH proporcionados aquí) pueden incluir la detección de un epítipo en un sujeto. Los métodos pueden incluir la detección de un linfocito, por ejemplo en un tumor de un sujeto. Los métodos pueden incluir determinar si un sujeto responderá a un agente terapéutico.
- 20
- 25 Cualquiera de los anticuerpos proporcionados aquí puede unirse a cualquier célula inmunitaria. Algunos ejemplos de células inmunitarias incluyen células T, células B, células plasmáticas, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, o mastocitos. El anticuerpo puede unirse a un marcador de inflamación. Por ejemplo, el anticuerpo útil en aplicaciones de diagnóstico que implican PET. El uso de anticuerpos para aplicaciones basadas en PET se conoce como inmunoPET (véase, por ejemplo, Knowles et al., "Advances in immuno-positron emission tomography: antibodies for molecular imaging in oncology". J Clin Oncol. 2012; 30:3884-3892). Dichos anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales que se sabe que se dirigen contra o se unen a células o tejidos cancerosos en el cuerpo de un sujeto. Por ejemplo, en la Tabla 3 de Salsano y Treglia, "PET imaging using radiolabeled antibodies: future direction in tumor diagnosis and correlate applications." Research and Reports in Nuclear Medicine. 2013; 3; 9-17, se proporciona una lista no limitativa de anticuerpos aprobados por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) y la Agencia Europea del Medicamento. La tabla se reproduce a continuación.
- 30

Tabla 3. Lista de anticuerpos monoclonales aprobados por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) y la Agencia Europea del Medicamento en la terapia del cáncer.

| Anticuerpo             | Nombre comercial       | Tipo                          | Tipo de anticuerpo diana | Aplicación                                          | Compañía        | Año de aprobación<br>UE USA |      |
|------------------------|------------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------|-----------------------------|------|
| Rituximab              | Rituxan, MabThera      | IgG1 quimérico                | CD20                     | Linfoma no de Hodgkin                               | Genentech       | 1998                        | 1997 |
| Trastuzumab            | Herceptin              | IgG1 humanizado               | HER2                     | Cáncer de mama                                      | Genentech/Roche | 2000                        | 1998 |
| Gemtuzumab ozogamicina | Mylotarg*              | IgG4 humanizado, inmunotoxina | CD33                     | Leucemia mieloide aguda                             | Wyeth/Pfizer    | NA                          | 2000 |
| Alemtuzumab            | MabCampath, Campath-IH | Humanized IgG1                | CD52                     | Leucemia mieloide crónica                           | Genzyme         | 2001                        | 2001 |
| Ibritumomab tiuxetan   | Zevalin                | IgG1 murino                   | CD20                     | Linfoma no de Hodgkin                               | Biogen Idec     | 2004                        | 2002 |
| Tositumomab            | Bexxar                 | IgG2a murino                  | CD20                     | Linfoma no de Hodgkin                               | Corixa/GSK      | NA                          | 2003 |
| Cetuximab              | Erbix                  | IgG1 quimérico                | EGFR                     | Cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello       | Imclone/Lilly   | 2004                        | 2004 |
| Bevacizumab            | Avastin                | IgG1 humanizado               | VEGF                     | Cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico | Genentech/Roche | 2005                        | 2004 |

|                           |          |                                        |              |                                                           |                  |             |      |
|---------------------------|----------|----------------------------------------|--------------|-----------------------------------------------------------|------------------|-------------|------|
| Panitumumab               | Vectibix | IgG2 humano                            | EGFR         | Cáncer colorrectal                                        | Amgen            | 2007        | 2006 |
| Ofatumumab                | Arzerra  | IgG1 humano                            | CD20         | Leucemia linfocítica crónica                              | Genmab           | 2010        | 2009 |
| Denosumab                 | Prolia   | IgG2 humano                            | Ligando RANK | Metástasis ósea, tumor óseo de células gigantes           | Amgen            | 2010        | 2010 |
| Ipilimumab                | Yervoy   | IgG1 humano                            | CTLA-4       | Melanoma                                                  | BMS              | 2011        | 2011 |
| Brentuximab vedotin       | Adcetris | IgG1 quimérico, conjugado con fármaco  | CD30         | Linfoma anaplásico de células grandes, linfoma de Hodgkin | Seattle Genetics | 2012        | 2011 |
| Pertuzumab                | Perjeta  | IgG1 humanizado                        | HER2         | Cáncer de mama                                            | Genentech/Roche  | 2013        | 2012 |
| Ado-trastuzumab emtansina | Kadeyla  | IgG1 humanizado, conjugado con fármaco | HER2         | Cáncer de mama                                            | Genentech/Roche  | En revisión | 2013 |

Nota: \*retirado en 2010.

Abreviaturas: CTLA 4, antígeno 4 de linfocito T citotóxico; EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; HER, receptor epidérmico humano; NA, no aprobado; VEGF, receptor del factor endotelial vascular.

5 Cualquiera de los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos en la Tabla 3 de Salsano y Treglia puede marcarse de acuerdo con los métodos proporcionados aquí. Otros anticuerpos susceptibles de marcaje como se describe aquí incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Wright y Lapi, "Designing the magic bullet? The advancement of immuno-PET into clinical use." J. Nucl. Med. 2013 agosto;54(8):1171-4. Estos anticuerpos (véase más abajo) se marcaron con éxito con isótopos, y se usaron en aplicaciones terapéuticas y/o de diagnóstico basadas en PET. Sin embargo, los anticuerpos se marcaron por medios químicos que no siempre permiten generar rápidamente anticuerpos marcados con isótopos que tienen una vida media corta. Por lo tanto, tales anticuerpos pueden marcarse rápida y eficientemente con cualquier isótopo deseado según los métodos, composiciones, reactivos y kits proporcionados aquí. Los anticuerpos descritos por Wright y Lapi incluyen:

10 A33 humanizado (huA33), que reconoce el antígeno A33, que se sabe que se expresa en más del 95% de los adenocarcinomas de colon humanos. En un estudio que utilizó huA33 radiomarcado (Carrasquillo et al., "124I-huA33 antibody PET of colorectal cancer." J. Nucl. Med. 2011;52:1173-1180), a 25 pacientes con cáncer colorrectal (CRC) primario o metastásico se les administraron 44,4-396 MBq (mediana, 343 MBq) de <sup>124</sup>I-huA33, con un total de 10 mg de huA33. No se observaron efectos secundarios adversos durante el tratamiento que pudieran atribuirse al huA33. El anticuerpo podría administrarse mediante administración intravenosa o infusión arterial hepática (HAI), sin que HAI proporcione ninguna ventaja detectable sobre la inyección intravenosa. Once pacientes tenían 12 tumores primarios, 10 de los cuales se detectaron mediante inmuno-PET. Diez pacientes tenían metástasis hepáticas, todas las cuales fueron detectadas por <sup>124</sup>I-huA33. Cuatro de 7 pacientes con metástasis ganglionares mostraron captación del <sup>124</sup>I-huA33, y 2 de 5 pacientes tenían lesiones pulmonares que se visualizaron mediante inmuno-PET.

20 Radretumab (L19SIP), que se dirige contra un epítipo contenido en el dominio B extra de fibronectina, se marcó con <sup>124</sup>I y se usó para establecer dosis provisionales de radretumab marcado con <sup>131</sup>I en 6 pacientes con metástasis cerebral (Poli et al., "Radretumab radioimmunotherapy in patients with brain metastasis: a 124I-L19SIP dosimetric PET study. Cancer Immunol Res. 2013;OF1-OF10).

25 Girentuximab (cG250), un anticuerpo quimérico que se une a la anhidrasa carbónica IX (CAIX), expresada en >95% del carcinoma renal de células claras (ccRcc), se marcó con <sup>124</sup>I y se usó para detectar tales cánceres (Divgi et al., "Positron emission tomography/computed tomography identification of clear cell renal cell carcinoma: results from the REDECT Trial." J. Clin. oncol. 2013; 31:187-194).

30 Panitumumab, un anticuerpo totalmente humanizado que se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), se marcó con éxito con <sup>89</sup>Zr y se usó para obtener imágenes de xenoinjertos de tumores colorrectales (Nayak et al., "PET and MR imaging of metastatic peritoneal and pulmonary colorectal cancer in mice with human epidermal growth factor receptor 1-targeted 89Zr-labeled panitumumab." J. Nucl. Med. 2012; 53:113-120; Chang et al., "Development and characterization of 89Zr-labeled panitumumab for immuno-positron emission tomographic imaging of the epidermal growth factor receptor." Mol. Imaging. 2013; 12:17-27).

U36, un anticuerpo quimérico que reconoce la región v6 de CD44, se marcó con  $^{89}\text{Zr}$  para obtener imágenes de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Borjesson et al. "Radiation dosimetry of  $^{89}\text{Zr}$ -labeled chimeric monoclonal antibody U36 as used for immuno-PET in head and neck cancer patients." J. Nucl. Med. 2009; 50:1828-1836).

- 5 Trastuzumab, cetuximab, y bevacizumab (véase la Tabla 4 anterior), también se etiquetaron con éxito con  $^{89}\text{Zr}$  y se usaron en aplicaciones de PET (Dijkers et al., "Biodistribution of  $^{89}\text{Zr}$ -trastuzumab and PET imaging of HER2-positive lesions in patients with metastatic breast cancer." Clin. Pharmacol. Ther. 2010;87:586-592; [www.cancer.gov/clinicaltrials/search/results?protocolsearchid511815785](http://www.cancer.gov/clinicaltrials/search/results?protocolsearchid511815785). Consultado el 15 de julio de 2013).

10 Cualquiera de los anticuerpos proporcionados aquí puede unirse a un antígeno tumoral. En general, un antígeno tumoral puede ser cualquier sustancia antigénica producida por una célula tumoral (por ejemplo, células tumorogénicas, o células del estroma tumoral, por ejemplo células asociadas a tumores, tales como fibroblastos asociados a cáncer). Un antígeno tumoral puede ser una molécula (o una parte de la misma) que las células tumorales expresan de manera diferencial en comparación con las células no tumorales. Un antígeno tumoral puede expresarse en la superficie de la célula. Los antígenos tumorales pueden incluir, por ejemplo, proteínas que normalmente se producen en cantidades  
15 muy pequeñas y se expresan en mayores cantidades por las células tumorales, proteínas que normalmente se producen sólo en ciertas etapas de desarrollo, proteínas cuya estructura (por ejemplo, secuencia o modificación o modificaciones postraduccionales) se modifica debido a una mutación en células tumorales, o proteínas normales que están (en condiciones normales) secuestradas del sistema inmunitario. Los antígenos tumorales pueden ser útiles en, por ejemplo, identificar o detectar células tumorales (por ejemplo, con fines de diagnóstico y/o con fines de  
20 monitorización de sujetos que han recibido tratamiento para un tumor, por ejemplo para evaluar la recurrencia), y/o con el fin de seleccionar dirigir agentes (por ejemplo, agentes terapéuticos) contra células tumorales. Por ejemplo, se puede proporcionar un anticuerpo radiomarcado que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une a un antígeno tumoral, lo que permite la detección del tumor *in vivo*, por ejemplo usando PET. Un antígeno tumoral puede ser un producto de expresión de un gen mutado, por ejemplo un oncogén o un gen supresor de tumores mutado, una proteína celular sobreexpresada o expresada de forma aberrante, un antígeno codificado por un virus oncogénico (por ejemplo, VHB; VHC; miembros de la familia del herpesvirus tales como EBV, KSV; virus del papiloma, etc.), o un antígeno oncofetal. Los antígenos oncofetales normalmente se producen en las primeras etapas del desarrollo embrionario y desaparecen en gran medida o completamente cuando el sistema inmunitario está completamente desarrollado. Los ejemplos son la alfafetoproteína (AFP, encontrada, por ejemplo, en tumores de células germinales y carcinoma hepatocelular) y antígeno carcinoembrionario (CEA, encontrado, por ejemplo, en cánceres de intestino y  
30 ocasionalmente en cánceres de pulmón y de mama). La tirosinasa es un ejemplo de una proteína que normalmente se produce en cantidades muy bajas, pero cuya producción aumenta mucho en ciertas células tumorales (por ejemplo, células de melanoma). Otros antígenos tumorales ejemplares incluyen, por ejemplo, CA-125 (encontrado, por ejemplo, en cáncer de ovario); MUC-1 (encontrado, por ejemplo, en cáncer de mama); antígeno tumoral epitelial (encontrado, por ejemplo, en cáncer de mama); antígeno asociado a melanoma (MAGE; encontrado, por ejemplo, en melanoma maligno); y fosfatasa ácida prostática (PAP, encontrado en el cáncer de próstata). Un antígeno tumoral puede estar expuesto al menos en parte en la superficie celular de las células tumorales. Un antígeno tumoral puede comprender un polipéptido o lípido anormalmente modificado, por ejemplo un glicolípido o glicoproteína de la superficie celular modificado de forma aberrante. Se apreciará que un antígeno tumoral puede ser expresado por un subconjunto de  
35 tumores de un tipo particular, y/o por un subconjunto de células en un tumor. Se conocen en la técnica antígenos tumorales ejemplares adicionales, y están dentro del alcance de esta descripción. Por ejemplo, los antígenos tumorales ejemplares se describen en los documentos WO 2014/183066 y US 20160122707.

Otros ejemplos de anticuerpos terapéuticos/diagnósticos, o fragmentos de los mismos, que son útiles en la producción de anticuerpos o proteínas radiomarcados según los métodos proporcionados aquí incluyen, pero no se limitan a, los  
45 siguientes anticuerpos, o fragmentos de los mismos (la diana del anticuerpo se da entre paréntesis junto con indicaciones terapéuticas ejemplares no limitativas):

Abciximab (glicoproteína IIb/IIIa; enfermedad cardiovascular), Adalimumab (TNF- $\alpha$ , diversos trastornos autoinmunes, por ejemplo artritis reumatoide), Alemtuzumab (CD52; leucemia linfocítica crónica), Basiliximab (receptor de IL-2R $\alpha$  (CD25); rechazo de trasplante), Bevacizumab (factor A de crecimiento endotelial vascular; diversos cánceres, por  
50 ejemplo cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, glioblastoma, cáncer de riñón; degeneración macular húmeda relacionada con la edad), Catumaxomab (CD3 y EpCAM, ascitis maligna), Cetuximab (receptor de EGF, diversos cánceres, por ejemplo cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello), Certolizumab (por ejemplo, Certolizumab pegol) (TNF alfa; enfermedad de Crohn, artritis reumatoide), Daclizumab (receptor de IL-2R $\alpha$  (CD25); rechazo de trasplante), Eculizumab (proteína C5 del complemento; hemoglobinuria paroxística nocturna), Efalizumab (CD11a; psoriasis), Gemtuzumab (CD33; leucemia mielógena aguda (por ejemplo, conjugado con caliqueamicina)), Ibritumomab tiuxetan (CD20; linfoma no de Hodgkin (por ejemplo, marcado con itrio-90 o indio-111)), Infliximab (TNF alfa; diversos trastornos autoinmunes, por ejemplo artritis reumatoide) Muromonab-CD3 (receptor de células T CD3; rechazo de trasplantes), Natalizumab (integrina alfa-4 ( $\alpha$ 4); esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn), Omalizumab (IgE; asma relacionada con alergias), Palivizumab (epítipo de RSV proteína F; infección por virus sincitial respiratorio),  
60 Panitumumab (receptor de EGF; cáncer, por ejemplo cáncer colorrectal), Ranibizumab (factor A de crecimiento endotelial vascular; degeneración macular húmeda relacionada con la edad) Rituximab (CD20; linfoma no de Hodgkin),

Tositumomab (CD20; linfoma no de Hodgkin), Trastuzumab (ErbB2; cáncer de mama), y cualquiera de sus fragmentos de unión a antígeno.

Cualquiera de los anticuerpos, o fragmentos de los mismos (por ejemplo, radiomarcados y/o PEGilados), descritos aquí, se puede usar para obtener imágenes de una respuesta inmunitaria. La obtención de imágenes *in vivo* de la respuesta inflamatoria, por ejemplo marcando los sitios de inflamación usando los métodos y composiciones proporcionados aquí, permite el diagnóstico, monitorización, y tratamiento no invasivos de los trastornos inflamatorios, como se describe aquí. Otros marcadores inflamatorios ejemplares a los que se pueden unir las proteínas radiomarcadas de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, citocinas, factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , IL-6, IL-1 beta, IL-8, IL-10, IL-12, IL-16, IL-18, proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), GRO- $\alpha$  (oncogén-a relacionado con el crecimiento), metaloproteínasa de la matriz-8 (MMP-8), CSF (factores estimulantes de colonias), péptido activador de neutrófilos derivado de células epiteliales-78 (ENA-78), CCL5 regulado en la activación de células T normales expresadas y secretadas (RANTES), CXCL6 (proteína quimiotáctica de granulocitos-2), CXCL9 MIG, CXCL10; IP-10, CXCL11, CXCL13 (BCA-1), Exodus-1 (CCL20), MIF (factor inhibidor de la migración de macrófagos): MIP-1alpha (CCL3), MIP-1beta (CCL4), CD11b, CD11c, CD13, CD15, CD66, CD14, CD64, CD66b, CD18, CD16, CD62L, CD67, HLA-DR, sHLA-G, dihidroepiandrosterona (DHEA)-S, Cortisol CRF (factor liberador de corticotropina), proteína de unión a CRF, alfa-defensina, beta-defensina, defensinas de neutrófilos (HNP 1-3), proteína bactericida/que aumenta la permeabilidad (BPI), calprotectina (MRP8/14), proteína A tensioactiva, proteína D tensioactiva, componente P de amiloide sérico, amiloide A sérico, factores del complemento, lectina de unión a manano, fibrinógeno, protrombina, factor VIII, factor de von Willebrand, plasminógeno, lectina de unión a manano, proteína c reactiva, pentaxina 3, receptores depuradores, lectinas de tipo C, receptor tipo Toll (TLR)-4, TLR-2, TLR-3, TLR-6, receptores de reconocimiento de patrones intracelulares (Nod1, Nod2, RIG-1, MDA-5), RAGE (receptor para el producto final de glicación avanzada), alfa 2-macroglobulina, ferritina, hepcidina, ceruloplasmina, haptoglobina, orosomucoide, alfa 1-antitripsina, alfa 1-antiquimotripsina, proteína de unión a lipopolisacáridos (LBP), albúmina, transferrina (incluyendo lactoferrina), transtiretina, proteína de unión a retinol, antitrombina, transcortina, adrenocorticotropina, urocortina, estriol, MMP-1, MMP-2, TIMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, metabolitos de araquidonato lipoxigenasa, prostaglandinas, prostacilinas, tromboxanos, leucotrienos, catalasa, caspasa-1 (inflamasa NALP3), leptina, adiponectina, resistina, visfatina, proteína 4 de unión a retinol (RBP4), endotoxina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), proteína 1 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-1), elastasa de neutrófilos, elastasa de leucocitos (ELA2, neutrófilos), SLPI (inhibidor de la proteasa de leucocitos secretores), proteína B de unión a calcio S100, proteína de choque térmico, endotelina-1, -2, angiopoyetina-2, proteína de unión a calcio, receptor desencadenante soluble expresado en células mieloides 1 (sTREM1), proteína-Z (glicoproteína plasmática dependiente de vitamina K), y factor tisular y factor activador de plaquetas (PAF).

Cualquiera de los anticuerpos, o fragmentos de los mismos (por ejemplo, radiomarcados y/o PEGilados), descritos aquí, se puede usar para obtener imágenes de células inmunitarias independientemente de una respuesta inmunitaria. Esto se puede hacer usando anticuerpos que detectan marcadores específicos de células inmunitarias que no son indicativos de una respuesta inmunitaria activa. Como ejemplo, se pueden obtener imágenes de células T sin tratamiento previo utilizando cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos radiomarcados, descritos aquí, que se unen a los marcadores de células T sin tratamiento previo CD3, CD4, CD45RA, CD45RB, CD197 o CD62L. Se puede encontrar más información sobre diversos tipos de células inmunitarias en, por ejemplo, Zhu, J., et al., Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu. Rev. Immunol.*, 28 (2010), pp. 445-489; S. Crotty, Follicular helper CD4 T cells (TFH), *Annu. Rev. Immunol.*, 29 (2011), pp. 621-663. Por supuesto, se entendería que algunos de estos marcadores (por ejemplo, CD3, CD4) también se podrían expresar en las células T implicadas en una respuesta inmunitaria, y se podrían usar como dianas para obtener imágenes de una respuesta inmunitaria.

Cualquiera de los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, (por ejemplo, radiomarcados y/o PEGilados), descritos aquí, se pueden utilizar para obtener imágenes de forma no invasiva de marcadores tumorales y/o de células T. Cualquiera de los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, (por ejemplo, radiomarcados y/o PEGilados), descritos aquí, se pueden utilizar para obtener imágenes de forma no invasiva de una célula tumoral y/o una célula T. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos radiomarcados detectan marcadores que incluyen, pero no se limitan a, PD-L1, PD-1, PD-2, CTLA-4, CD3, CD4, CD8, y CD28.

Cualquiera de los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, (por ejemplo, radiomarcados y/o PEGilados), descritos aquí, se unen a proteínas implicadas en rutas de puntos de control inmunitarios. Las "rutas de puntos de control inmunitarios" o "puntos de control inmunitarios" son rutas inhibitorias del sistema inmunitario que existen de forma natural y que desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la autotolerancia y en la modulación de la duración y el nivel de producción efectora (por ejemplo, en el caso de las células T, los niveles de producción de citocinas, proliferación o potencial de eliminación de dianas) de las respuestas inmunitarias fisiológicas con el fin de minimizar el daño a los tejidos del individuo que monta la respuesta inmunitaria. Tales rutas pueden, por ejemplo, modular negativamente la actividad de las células T o potenciar la actividad inmunosupresora de las células T reguladoras. Los ejemplos de rutas de puntos de control inmunitarios incluyen, pero no se limitan a, la ruta PD-1 y la ruta CTLA-4 y la ruta TIM3. Los tumores con frecuencia eligen ciertas rutas de puntos de control inmunitarios como un mecanismo importante de resistencia inmunitaria, por ejemplo contra las células T que son específicas para los antígenos tumorales. Además, la exposición crónica a antígenos, como ocurre en el cáncer, puede conducir a altos niveles de expresión de proteínas de puntos de control inmunitarios (por ejemplo, PD1, PD-L1, PD-L2) por parte de

las células inmunitarias, lo que puede inducir un estado de agotamiento o anergia de las células T. Ciertas proteínas de puntos de control inmunitarios, tales como CTLA4 y PD1, se expresan en gran medida en células T reguladoras (T<sub>Reg</sub>), y pueden potenciar su proliferación. Muchos tumores están altamente infiltrados con células T<sub>Reg</sub> que probablemente suprimen las respuestas inmunitarias efectoras. Por lo tanto, el bloqueo de la ruta PD1 y/o la ruta CTLA4 puede potenciar las respuestas inmunitarias antitumorales al disminuir el número y/o la actividad supresora de células T<sub>Reg</sub> intratumorales. Ciertos aspectos de la descripción utilizan las proteínas radiomarcadas (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos radiomarcados) para diagnosticar o monitorizar una enfermedad o afección (por ejemplo, cáncer) o la respuesta de una enfermedad o afección (por ejemplo, cáncer) a la terapia. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos radiomarcados pueden usarse para detectar si un tumor expresa un marcador de puntos de control inmunitarios (por ejemplo, una proteína de puntos de control inmunitarios) y/o para detectar si un tumor contiene células inmunitarias que expresan un marcador de puntos de control inmunitarios (por ejemplo, una proteína de puntos de control inmunitarios). Las proteínas radiomarcadas de la invención (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos radiomarcados) se unen a un modulador de puntos de control inmunitarios. El modulador de puntos de control inmunitarios puede ser un inhibidor de puntos de control inmunitarios. "Inhibidor de puntos de control inmunitarios" se refiere a cualquier agente que inhibe (suprime, reduce la actividad de) una ruta de puntos de control inmunitarios. El modulador de puntos de control inmunitarios puede ser un activador de puntos de control inmunitarios. "Activador de puntos de control inmunitarios" se refiere a cualquier agente que activa (estimula, aumenta la actividad de) una ruta de puntos de control inmunitarios.

Los inhibidores de puntos de control inmunitarios, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se unen a las proteínas de puntos de control inmunitarios tales como CTLA4, PD1, PD-L1, han mostrado una eficacia notable en el tratamiento de una variedad de tipos de cáncer diferentes, incluidos los cánceres avanzados, y no han respondido a los agentes quimioterapéuticos convencionales, y/o tienen un mal pronóstico, tal como melanoma metastásico (véase, por ejemplo, Pardoll, DM, The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy, Nat Rev Cancer. 2012; 12(4):252-64). Sin embargo, no todos los sujetos con tumores de un tipo particular pueden beneficiarse del tratamiento con un inhibidor de puntos de control inmunitarios dado. Un experto apreciaría que un beneficio podría ser, por ejemplo, una enfermedad estable en lugar de una enfermedad progresiva, una reducción eventual del número y/o el volumen de las lesiones tumorales, una mayor supervivencia media, etc. La detección de marcadores de puntos de control inmunitarios utilizando cualquiera de los métodos descritos aquí puede usarse para determinar si administrar o no un tratamiento y/o seleccionar un agente terapéutico (por ejemplo, entre múltiples opciones terapéuticas diferentes). Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo radiomarcado que se une a PD-L1 para detectar si un tumor dentro de un paciente expresa PD-L1. A los pacientes que tienen un tumor positivo para PD-L1 se les puede administrar entonces un agente terapéutico que se dirige a la ruta de PD1, por ejemplo un agente terapéutico (tal como un anticuerpo) que se dirige a PD1 o PD-L1. Una proteína radiomarcada (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo radiomarcado) que se une a PD1 se puede usar para detectar si un tumor dentro de un paciente es positivo para PD1 (por ejemplo, debido a la presencia de células inmunitarias que expresan altos niveles de PD1). A los pacientes que tienen un tumor positivo para PD1 se les puede administrar entonces un agente terapéutico que se dirige a la ruta PD1. Una proteína radiomarcada (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo radiomarcado) que se une a TIM3 se puede usar para detectar si un tumor dentro de un paciente es positivo para TIM3 (por ejemplo, debido a la presencia de células inmunitarias que expresan altos niveles de TIM3). A los pacientes que tienen un tumor positivo para TIM3 se les puede administrar entonces un agente terapéutico que se dirige a la ruta de TIM3, por ejemplo un agente terapéutico (tal como un anticuerpo) que se dirige a TIM3. Una proteína radiomarcada (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo radiomarcado) que se une a CTLA4 puede usarse para detectar si un tumor dentro de un paciente es positivo para CTLA4 (por ejemplo, debido a la presencia de células inmunitarias que expresan altos niveles de CTLA4). A los pacientes que tienen un tumor positivo para CTLA4 se les puede administrar entonces un agente terapéutico que se dirige a la ruta de CTLA4, por ejemplo un agente terapéutico (tal como un anticuerpo) que se dirige a CTLA4. Se pueden obtener imágenes de un sujeto con un tumor con dos, tres o más proteínas radiomarcadas (por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos) que se unen a diferentes proteínas de puntos de control inmunitarios (por ejemplo, proteínas implicadas en diferentes rutas de puntos de control inmunitarios). Se identifican una o más rutas de puntos de control inmunitarios que son positivas en el tumor. A continuación, se trata al paciente con uno o más agentes que se dirigen a aquellas rutas de puntos de control inmunitarios para las que un tumor (o uno o más tumores) en el sujeto es positivo. Si el tumor es negativo para una ruta de puntos de control inmunitarios o proteína de puntos de control inmunitarios en particular, se puede administrar un tratamiento alternativo en lugar de un inhibidor de puntos de control inmunitarios que se dirigiría a esa ruta de puntos de control inmunitarios o proteína de puntos de control inmunitarios. Otros aspectos de la descripción utilizan los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos radiomarcados para monitorizar la respuesta a un agente terapéutico, o para monitorizar la expresión de una proteína, tal como una proteína inhibidora de puntos de control inmunitarios. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo radiomarcado, descrito aquí, puede usarse para detectar si se ha generado, potenciado o suprimido una respuesta inmunitaria en un sitio de interés, tal como el sitio de un tumor o un sitio de infección, o si el tumor expresa una proteína de puntos de control inmunitarios (por ejemplo, PD-L1). Una proteína radiomarcada que se une a una célula inmunitaria, por ejemplo una célula T, puede administrarse a un sujeto antes, al mismo tiempo y/o después de la administración de un tratamiento destinado a potenciar o inhibir una respuesta inmunitaria. Las imágenes pueden compararse antes y después del tratamiento para evaluar el efecto del tratamiento en la respuesta inmunitaria. Las proteínas radiomarcadas de la invención pueden usarse para monitorizar la respuesta a un agente terapéutico al menos cada 1 día, al menos cada 5 días, al menos cada 10 días, al menos cada 15 días, al menos cada 30 días, al menos cada 45 días, al menos al menos cada 60 días, al menos cada 120

días, al menos cada 180 días, al menos cada 240 días, o al menos cada año. Un sujeto se puede monitorizar durante, por ejemplo, hasta 3, 6, 9 meses, hasta 1, 2, 5 años, o más. Un agente terapéutico que se dirige a una ruta inhibidora de puntos de control inmunitarios puede ser un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano. El anticuerpo puede ser un anticuerpo IgG, por ejemplo un anticuerpo IgG1 o IgG4. Un agente terapéutico que se dirige a la ruta de CTLA4 puede ser un anticuerpo monoclonal que se une a CTLA4, tal como ipilimumab (Yervoy) o tremilimumab. Un agente terapéutico que se dirige a la ruta de PD1 puede ser un anticuerpo monoclonal que se une a PD1, tales como nivolumab (un anticuerpo monoclonal IgG4 completamente humano), pidilizumab (también conocido como CT-011, un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado), o pembrolizumab (Keytruda, anteriormente lambrolizumab; también conocido como MK-3475), un anticuerpo monoclonal IgG4 humanizado), o MEDI0680 (AMP-514, un mAb IgG4 humanizado contra PD-1). Un agente terapéutico que se dirige a la ruta de PD1 puede ser un anticuerpo monoclonal que se une a PD-L1, tales como BMS-936559 (un anticuerpo monoclonal IgG4 completamente humano), MPDL3280A (monoclonal humano, Genentech), MSB0010718C (Merck Serono), o MEDI4736. Un agente terapéutico que se dirige a la ruta de PD1 puede ser un anticuerpo monoclonal que se une a PD-L2. Un agente terapéutico que se dirige a la ruta de PD1 puede ser una proteína de fusión recombinante que comprende un dominio extracelular de PD-L2, tal como AMP-224. Una variedad de inhibidores de la ruta de PD1, por ejemplo anticuerpos que se unen a PD-1, PD-L1 o PD-L2, se describen en publicaciones de patentes U.S. nº 20040213795, 20110195068, 20120039906, 20120114649, 20130095098, 20130108651, 20130109843, 20130237580, y 20130291136.

El sujeto puede padecer un tumor sólido. El sujeto puede padecer melanoma, carcinoma de células renales, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de ovario, cáncer de cerebro (por ejemplo, glioblastoma), linfoma (por ejemplo, linfoma no de Hodgkin), hepatocelular, esofágico, de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo), mieloma múltiple, o cáncer de páncreas. El sujeto puede tener un cáncer metastásico, un cáncer en etapa III, o un cáncer en etapa IV.

Se entendería que el inhibidor de puntos de control inmunitarios podría administrarse como agente único o en combinación con uno o más agentes antitumorales.

#### Propiedades

Cualquiera de los anticuerpos, o fragmentos de los mismos (por ejemplo, radiomarcados y/o PEGilados), descritos aquí, son capaces de alcanzar sus dianas y se eliminan rápidamente de la circulación. Los anticuerpos completos y sus fragmentos tienen diferentes características que determinan sus propiedades de direccionamiento, tal como la rapidez con la que alcanzan el antígeno diana y se eliminan de la sangre, qué órgano elimina el anticuerpo de la sangre, la penetración en el tumor, y la cantidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo radiomarcado inyectado que se une a la diana. Una vez que los anticuerpos se dirigen a sus respectivos antígenos, generalmente se unen con gran avidéz, lo que a su vez determina su tiempo de permanencia en el tumor, mientras que el anticuerpo no unido es procesado por varios órganos del cuerpo y finalmente degradado y excretado. La IgG entera, que es la principal forma de anticuerpo utilizada, se elimina muy lentamente de la sangre, requiriendo varios días antes de que una cantidad suficiente salga de la circulación para permitir que la concentración específica introducida en el tumor se distinga de la radiactividad de la sangre y del tejido adyacente. Su eliminación lenta se debe en parte a su gran tamaño (aproximadamente 150.000 Da) que impide su extravasación, lo que resulta en una acumulación tumoral lenta. A medida que el tamaño molecular de un anticuerpo se reduce de un fragmento F(ab')<sub>2</sub> divalente (aproximadamente 100.000 Da) a un fragmento Fab de unión monovalente (aproximadamente 50.000 Da), hay una eliminación progresivamente más rápida de la sangre. La ingeniería molecular ha permitido la formación de estructuras de anticuerpos aún más pequeñas, tal como scFv (aproximadamente 25.000 Da), que se eliminan de la sangre aún más rápidamente. Véase Goldenberg D. M. et al., "Novel radiolabeled antibody conjugates." *Oncogene*.2007, 26, 3734-3744. En consecuencia, cualquiera de los anticuerpos, o fragmentos de los mismos (por ejemplo, radiomarcados y/o PEGilados), descritos aquí, tienen un peso molecular menor que 60 kDa, menor que 55 kDa, menor que 50 kDa, menor que 45 kDa, menor que 40 kDa, menor que 35 kDa, menor que 30 kDa, menor que 25 kDa menor que 20 kDa, menor que 15 kDa, menor que 10 kDa, o menor que 5 kDa. Las proteínas radiomarcadas (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos), descritas aquí, tienen un peso molecular que oscila de 5 kDa-15 kDa, de 5 kDa-20kDa, de 5 kDa-25 kDa, de 5 kDa-30kDa, de 5 kDa-35 kDa, de 5 kDa-40kDa, de 5 kDa-45 kDa, de 5 kDa-55kDa, de 5 kDa-60kDa, from15 kDa-20 kDa, de 15 kDa-25 kDa, de 15 kDa-30 kDa, de 15 kDa-35 kDa, de 15 kDa-40 kDa, de 15 kDa-45 kDa, de 15 kDa-50 kDa, de 15 kDa-55 kDa, de 15 kDa-60 kDa, de 25 kDa-35 kDa, de 25 kDa-45 kDa, de 25 kDa-55 kDa, de 25 kDa-60 kDa, de 35 kDa-45 kDa, de 35 kDa-55 kDa, de 35 kDa-60 kDa, de 45 kDa-55 kDa, de 45 kDa-60 kDa, o de 50 kDa-60 kDa. Cualquiera de los anticuerpos, o fragmentos de los mismos (por ejemplo, radiomarcados y/o PEGilados), descritos aquí, puede eliminarse convenientemente de la circulación después de la inyección en un paciente. Al menos el 95% de las proteínas radiomarcadas (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos) se eliminan de la sangre en 20 minutos, en 30 minutos, en 40 minutos, en 60 minutos, en 80 minutos, en 30 minutos, en 40 minutos, en 60 minutos, dentro de 90 minutos, en 2 horas, en 3 horas, en 4 horas, en 6 horas, en 8 horas, en 10 horas o en 12 horas. Al menos el 95% de las proteínas radiomarcadas (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos) se eliminan del cuerpo en 20 minutos, en 30 minutos, en 40 minutos, en 60 minutos, en 80 minutos, en 30 minutos, en 40 minutos, en 60 minutos, dentro de 90 minutos, en 2 horas, en 3 horas, en 4 horas, en 6 horas, en 8 horas, en 10 horas o en 12 horas.

#### Polímeros hidrófilos

Algunos aspectos de la descripción se refieren al uso de polímeros hidrófilos y a métodos para conjugar polímeros hidrófilos con un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de dominio único). Como se usa aquí, un "polímero hidrófilo" se refiere a una molécula (por ejemplo, una macromolécula) compuesta por tres o más unidades repetitivas que contienen grupos funcionales polares o cargados, haciéndolas solubles en agua. El polímero hidrófilo puede ser soluble hasta al menos 50 mg/ml en agua, hasta al menos 100 mg/ml en agua, hasta al menos 150 mg/ml en agua, hasta al menos 200 mg/ml en agua, hasta al menos 250 mg/ml en agua, hasta al menos 300 mg/ml en agua, hasta al menos 400 mg/ml en agua, hasta al menos 500 mg/ml en agua, hasta al menos 600 mg/ml en agua, hasta al menos 700 mg/ml en agua, hasta al menos 800 mg/ml en agua, hasta al menos 900 mg/ml en agua, o hasta al menos 1000 mg/ml en agua a 20°C. El polímero hidrófilo puede ser un polímero lineal. El polímero hidrófilo puede ser un polímero ramificado, que puede configurarse de varias maneras. El polímero hidrófilo puede tener un tamaño adecuado y/o una estructura lineal o ramificada adecuada para conferir propiedades mejoradas a cualquiera de los anticuerpos proporcionados aquí. El polímero hidrófilo puede tener un tamaño de 5 kDa a 40 kDa. El polímero puede tener un tamaño de al menos 5 kDa, al menos 10 kDa, al menos 15 kDa, al menos 20 kDa, al menos 25 kDa, al menos 30 kDa, al menos 40 kDa.

El polímero hidrófilo útil en la presente descripción puede ser un polímero sintético. El polímero hidrófilo puede no ser un polipéptido, polinucleótido o polisacárido. Los ejemplos de polímeros sintéticos hidrófilos incluyen, sin limitación, polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP), alcohol polivinílico (PVA), ácido poliacrílico (PAA), poliacrilamida, N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMA), diviniléter-anhídrido maleico (DIVEMA), polioxazolina, polifosfoéster (PPE), polietilenimina (PEI) y polifosfaceno. Sin embargo, debe apreciarse que pueden usarse otros polímeros sintéticos, y se considera que están dentro del alcance de esta descripción.

Cualquiera de los polímeros hidrófilos proporcionados aquí puede ser polímeros naturales. Los ejemplos de polímeros naturales incluyen, sin limitación, polisacáridos, goma de xantano, pectinas, derivados de quitosano, dextrano, carragenano, goma guar, éteres de celulosa (por ejemplo, CMC de sodio, HPC y HPMC), ácido hialurónico (HA), albúmina, y almidón o derivados a base de almidón. Sin embargo, debe apreciarse que pueden usarse otros polímeros sintéticos, y están dentro del alcance de esta descripción. Los polímeros hidrófilos adicionales serían evidentes para el experto, y están dentro del alcance de esta descripción. Por ejemplo, los polímeros hidrófilos ejemplares se han descrito previamente Veeran, G. K., et al., "Water Soluble Polymers for Pharmaceutical Applications" *Polymers* 2011, 3, 1972-2009. Debe apreciarse que la PEGilación también se refiere a la adición de cualquier polímero hidrófilo, por ejemplo cualquiera de los polímeros hidrófilos proporcionados aquí.

#### Restos quelantes

Algunos aspectos de la descripción proporcionan restos quelantes y métodos para conjugar restos quelantes con anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de dominio único). Como se usa aquí, un "resto quelante" es un agente cuyas moléculas pueden formar varios enlaces con un solo ion metálico. El resto quelante puede ser un agente que se une a un radionúclido. El resto quelante puede ser un agente que se une a rubidio-82, cobre-61, cobre-62, cobre-64, itrio-86, galio-68, circonio-89. Sin embargo, debe apreciarse que el resto quelante puede ser un agente que se une a metales radiactivos adicionales. Ejemplos de restos quelantes incluyen, sin limitación, ácido 1,4,7-triazaciclono-nano-triacético (NOTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclodecano-tetraacético (DOTA), triazaciclono-nano-fosfinato (TRAP) o desferrioxamina (DFO). Sin embargo, debe apreciarse que pueden usarse restos quelantes adicionales, y están dentro del alcance de esta descripción. Se han descrito en la técnica radionúclidos metálicos y queladores ejemplares, y están dentro del alcance de esta descripción. Por ejemplo, se han descrito radionúclidos metálicos y queladores ejemplares en Liu X., et al., "A Brief Review of Chelators for Radiolabeling Oligomers" *Materials*, 2010, 3, 3204-3217.

#### Definiciones de química

Las definiciones de grupos funcionales específicos y términos químicos se describen con más detalle a continuación. Los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla Periódica de los Elementos, versión CAS, *Handbook of Chemistry and Physics*, 75ª Ed., cubierta interior, y los grupos funcionales específicos se definen generalmente como se describe allí. Además, los principios generales de la química orgánica, así como los restos funcionales específicos y la reactividad, se describen en *Organic Chemistry*, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999; Smith y March *March's Advanced Organic Chemistry*, 5ª edición, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2001; Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers, Inc., Nueva York, 1989; y Carruthers, *Some Modern Methods of Organic Synthesis*, 3ª edición, Cambridge University Press, Cambridge, 1987.

Los compuestos descritos aquí pueden comprender uno o más centros asimétricos, y por lo tanto pueden existir en diversas formas estereoisómeras, por ejemplo enantiómeros y/o diastereómeros. Por ejemplo, los compuestos descritos aquí pueden estar en forma de un enantiómero, diastereómero o isómero geométrico individual, o pueden estar en forma de una mezcla de estereoisómeros, incluidas mezclas racémicas y mezclas enriquecidas en uno o más estereoisómeros. Los isómeros se pueden aislar de mezclas mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen cromatografía de líquidos de alta presión quiral (HPLC) y la formación y cristalización de sales quirales; o los isómeros preferidos pueden prepararse mediante síntesis asimétrica. Véanse, por ejemplo Jacques et al., *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley Interscience, Nueva York, 1981); Wilen et al., *Tetrahedron* 33:2725 (1977); Eliel, E.L. *Stereochemistry of Carbon Compounds* (McGraw-Hill, NY, 1962); y Wilen, S.H. *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions* p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972).

La descripción abarca adicionalmente compuestos como isómeros individuales sustancialmente libres de otros isómeros, y alternativamente, como mezclas de diversos isómeros.

En una fórmula, --- está ausente, es un enlace de coordinación entre un ligando y un metal, o es un enlace sencillo.

- 5 Cuando se enumera un intervalo de valores, se pretende abarcar cada valor y subintervalo dentro del intervalo. Por ejemplo "alquilo de C<sub>1-6</sub>" pretende abarcar alquilo de C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>1-6</sub>, C<sub>1-5</sub>, C<sub>1-4</sub>, C<sub>1-3</sub>, C<sub>1-2</sub>, C<sub>2-6</sub>, C<sub>2-5</sub>, C<sub>2-4</sub>, C<sub>2-3</sub>, C<sub>3-6</sub>, C<sub>3-5</sub>, C<sub>3-4</sub>, C<sub>4-6</sub>, C<sub>4-5</sub>, y C<sub>5-6</sub>.

10 El término "alifático", como se usa aquí, incluye hidrocarburos tanto saturados como insaturados, no aromáticos, de cadena lineal (es decir, no ramificados), ramificados, acíclicos y cíclicos (es decir, carbocíclicos), que están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos funcionales. Como apreciará un experto normal en la técnica, "alifático" pretende incluir aquí, pero no se limita a, restos alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, y cicloalquino. Por lo tanto, como se usa aquí, el término "alquilo" incluye grupos alquilo lineales, ramificados y cíclicos. Se aplica una convención análoga a otros términos genéricos tales como "alqueno", "alquino", y similares. Además, como se usa aquí, los términos "alquilo", "alqueno", "alquino", y similares abarcan tanto grupos sustituidos como no sustituidos. Como se usa aquí, "alifático" se usa para indicar aquellos grupos alifáticos (cíclicos, acíclicos, sustituidos, 15 no sustituidos, ramificados o no ramificados) que tienen 1-20 átomos de carbono (C<sub>1-20</sub> alifático). El grupo alifático puede tener 1-10 átomos de carbono (C<sub>1-10</sub> alifático). El grupo alifático puede tener 1-6 átomos de carbono (C<sub>1-6</sub> alifático). El grupo alifático puede tener 1-5 átomos de carbono (C<sub>1-5</sub> alifático). El grupo alifático puede tener 1-4 átomos de carbono (C<sub>1-4</sub> alifático). El grupo alifático puede tener 1-3 átomos de carbono (C<sub>1-3</sub> alifático). El grupo alifático puede tener 1-2 átomos de carbono (C<sub>1-2</sub> alifático). Los sustituyentes del grupo alifático incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los sustituyentes descritos aquí, que dan como resultado la formación de un resto estable.

20 El término "heteroalifático", como se usa aquí, se refiere a restos alifáticos que contienen uno o más átomos de oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo o silicio, por ejemplo, en lugar de átomos de carbono. Los restos heteroalifáticos pueden ser ramificados, no ramificados, cíclicos o acíclicos, e incluyen heterociclos saturados e insaturados tales como morfolino, pirrolidino, etc. Los restos heteroalifáticos pueden estar sustituidos mediante reemplazo independiente de uno o más de los átomos de hidrógeno en ellos por uno o más restos que incluyen, pero no se limitan a, alifático; heteroalifático; arilo; heteroarilo; arilalquilo; heteroarilalquilo; alcoxi; arilo; heteroalcoxi; heteroarilo; alquilo; arilo; heteroalquilo; heteroarilo; -F; -Cl; -Br; -I; -OH; -NO<sub>2</sub>; -CN; -CF<sub>3</sub>; -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>; -CHCl<sub>2</sub>; -CH<sub>2</sub>OH; -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH; -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>; -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; -C(O)R<sub>x</sub>; -CO<sub>2</sub>(R<sub>x</sub>); -CON(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -OC(O)R<sub>x</sub>; -OCO<sub>2</sub>R<sub>x</sub>; -OCON(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -N(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -S(O)<sub>2</sub>R<sub>x</sub>; -NR<sub>x</sub>(CO)R<sub>x</sub>, en los que cada aparición de R<sub>x</sub> independientemente incluye, pero no se limita a, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, arilalquilo o heteroarilalquilo, en el que cualquiera de los sustituyentes alifáticos, heteroalifáticos, arilalquilo o heteroarilalquilo descritos anteriormente y aquí puede estar sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, cíclico o acíclico, y en el que cualquiera de los sustituyentes arilo o heteroarilo descritos anteriormente y aquí puede estar sustituido o no sustituido. Los ejemplos adicionales de sustituyentes generalmente aplicables se ilustran por los Ejemplos que se describen aquí.

35 El término "alquilo", como se usa aquí, se refiere a radicales hidrocarbonados saturados de cadena lineal o ramificada derivados de un resto hidrocarbonado que contiene entre uno y veinte átomos de carbono mediante la eliminación de un solo átomo de hidrógeno. El grupo alquilo empleado en la descripción puede contener de 1-20 átomos de carbono (alquilo de C<sub>1-20</sub>). El grupo alquilo empleado puede contener de 1-15 átomos de carbono (alquilo de C<sub>1-15</sub>). El grupo alquilo empleado puede contener de 1-10 átomos de carbono (alquilo de C<sub>1-10</sub>). El grupo alquilo empleado puede contener de 1-8 átomos de carbono (alquilo de C<sub>1-8</sub>). El grupo alquilo empleado puede contener de 1-6 átomos de carbono (alquilo de C<sub>1-6</sub>). El grupo alquilo empleado puede contener de 1-5 átomos de carbono (alquilo de C<sub>1-5</sub>). El grupo alquilo empleado puede contener de 1-4 átomos de carbono (alquilo de C<sub>1-4</sub>). El grupo alquilo empleado puede contener de 1-3 átomos de carbono (alquilo de C<sub>1-3</sub>). El grupo alquilo empleado puede contener 1-2 átomos de carbono (alquilo de C<sub>1-2</sub>). Los ejemplos de radicales alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo, sec-pentilo, isopentilo, terc-butilo, n-pentilo, neopentilo, n-hexilo, sec-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-decilo, n-undecilo, dodecilo y similares, que pueden tener uno o más sustituyentes. Los sustituyentes del grupo alquilo incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los sustituyentes descritos aquí, que dan como resultado la formación de un resto estable. El término "alqueno", como se usa aquí, se refiere a un birradical derivado de un grupo alquilo, como se define aquí, por eliminación de dos átomos de hidrógeno. Los grupos alqueno pueden ser cíclicos o acíclicos, ramificados o no ramificados, sustituidos o no sustituidos. Los sustituyentes del grupo alqueno incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los sustituyentes descritos aquí, que dan como resultado la formación de un resto estable.

50 El término "alqueno", como se usa aquí, denota un grupo monovalente derivado de un resto hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono por eliminación de un solo átomo de hidrógeno. El grupo alqueno empleado en la descripción puede contener de 2-20 átomos de carbono (alqueno de C<sub>2-20</sub>). El grupo alqueno empleado en la descripción puede contener de 2-15 átomos de carbono (alqueno de C<sub>2-15</sub>). El grupo alqueno empleado puede contener de 2-10 átomos de carbono (alqueno de C<sub>2-10</sub>). El grupo alqueno puede contener de 2-8 átomos de carbono (alqueno de C<sub>2-8</sub>). El grupo alqueno puede contener de 2-6 carbonos (alqueno de C<sub>2-6</sub>). El grupo alqueno puede contener de 2-5 carbonos (alqueno de C<sub>2-5</sub>). El grupo alqueno puede contener de 2-4 carbonos (alqueno de C<sub>2-4</sub>). El grupo alqueno puede contener 2-3 carbonos (alqueno de C<sub>2-3</sub>). El grupo alqueno puede contener 2 carbonos (alqueno de C<sub>2</sub>). Los grupos alqueno incluyen, por ejemplo, etenilo, propenilo, butenilo,

1-metil-2-buten-1-ilo y similares, que pueden tener uno o más sustituyentes. Los sustituyentes del grupo alquenilo incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los sustituyentes descritos aquí, que dan como resultado la formación de un resto estable. El término “alquenileno”, como se usa aquí, se refiere a un birradical derivado de un grupo alquenilo, como se define aquí, por eliminación de dos átomos de hidrógeno. Los grupos alquenileno pueden ser cíclicos o acíclicos, ramificados o no ramificados, sustituidos o no sustituidos. Los sustituyentes del grupo alquenileno incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los sustituyentes descritos aquí, que dan como resultado la formación de un resto estable.

El término “alquinilo”, como se usa aquí, se refiere a un grupo monovalente derivado de un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono por eliminación de un solo átomo de hidrógeno. El grupo alquinilo empleado en la descripción puede contener de 2-20 átomos de carbono (alquinilo de C<sub>2-20</sub>). El grupo alquinilo empleado en la descripción puede contener de 2-15 átomos de carbono (alquinilo de C<sub>2-15</sub>). El grupo alquinilo empleado puede contener de 2-10 átomos de carbono (alquinilo de C<sub>2-10</sub>). El grupo alquinilo puede contener de 2-8 átomos de carbono (alquinilo de C<sub>2-8</sub>). El grupo alquinilo puede contener de 2-6 átomos de carbono (alquinilo de C<sub>2-6</sub>). El grupo alquinilo puede contener de 2-5 átomos de carbono (alquinilo de C<sub>2-5</sub>). El grupo alquinilo puede contener de 2-4 átomos de carbono (alquinilo de C<sub>2-4</sub>). El grupo alquinilo puede contener 2-3 átomos de carbono (alquinilo de C<sub>2-3</sub>). El grupo alquinilo puede contener 2 átomos de carbono (alquinilo de C<sub>2</sub>). Los grupos alquinilo representativos incluyen, pero no se limitan a, etinilo, 2-propinilo (propargilo), 1-propinilo, y similares, que pueden portar uno o más sustituyentes. Los sustituyentes del grupo alquinilo incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los sustituyentes descritos aquí, que dan como resultado la formación de un resto estable. El término “alquinileno”, como se usa aquí, se refiere a un birradical derivado de un grupo alquinileno, como se define aquí, por eliminación de dos átomos de hidrógeno. Los grupos alquinileno pueden ser cíclicos o acíclicos, ramificados o no ramificados, sustituidos o no sustituidos. Los sustituyentes del grupo alquinileno incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los sustituyentes descritos aquí, que dan como resultado la formación de un resto estable.

El término “heteroalquilo” se refiere a un grupo alquilo, que incluye además al menos un heteroátomo (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4 heteroátomos) seleccionado de oxígeno, nitrógeno o azufre dentro de (es decir, insertado entre átomos de carbono adyacentes de) y/o colocado en una o más posiciones terminales de la cadena principal. Un grupo heteroalquilo puede referirse a un grupo saturado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono y 1 o más heteroátomos en la cadena principal (“hetero-alquilo de C<sub>1-10</sub>”). Un grupo heteroalquilo puede ser un grupo saturado que tiene de 1 a 9 átomos de carbono y 1 o más heteroátomos en la cadena principal (“hetero-alquilo de C<sub>1-9</sub>”). Un grupo heteroalquilo puede ser un grupo saturado que tiene de 1 a 8 átomos de carbono y 1 o más heteroátomos en la cadena principal (“hetero-alquilo de C<sub>1-8</sub>”). Un grupo heteroalquilo puede ser un grupo saturado que tiene de 1 a 7 átomos de carbono y 1 o más heteroátomos en la cadena principal (“hetero-alquilo de C<sub>1-7</sub>”). Un grupo heteroalquilo puede ser un grupo saturado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono y 1 o más heteroátomos en la cadena principal (“hetero-alquilo de C<sub>1-6</sub>”). Un grupo heteroalquilo puede ser un grupo saturado que tiene de 1 a 5 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos en la cadena principal (“hetero-alquilo de C<sub>1-5</sub>”). Un grupo heteroalquilo puede ser un grupo saturado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos en la cadena principal (“hetero-alquilo de C<sub>1-4</sub>”). Un grupo heteroalquilo puede ser un grupo saturado que tiene de 1 a 3 átomos de carbono y 1 heteroátomo en la cadena principal (“hetero-alquilo de C<sub>1-3</sub>”). Un grupo heteroalquilo puede ser un grupo saturado que tiene de 1 a 2 átomos de carbono y 1 heteroátomo en la cadena principal (“hetero-alquilo de C<sub>1-2</sub>”). Un grupo heteroalquilo puede ser un grupo saturado que tiene 1 átomo de carbono y 1 heteroátomo (“hetero-alquilo de C<sub>1</sub>”). Un grupo heteroalquilo puede ser un grupo saturado que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos en la cadena principal (“hetero-alquilo de C<sub>2-6</sub>”). A menos que se especifique lo contrario, cada aparición de un grupo heteroalquilo está independientemente no sustituida (un “heteroalquilo no sustituido”) o sustituida (un “heteroalquilo sustituido”) con uno o más sustituyentes. El grupo heteroalquilo puede ser un heteroalquilo de C<sub>1-10</sub> no sustituido. El grupo heteroalquilo puede ser un heteroalquilo de C<sub>1-10</sub> sustituido.

El término “heteroalquenilo” se refiere a un grupo alquenilo, que incluye además al menos un heteroátomo (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 heteroátomos) seleccionado de oxígeno, nitrógeno o azufre dentro de (es decir, insertado entre átomos de carbono adyacentes de) y/o colocado en una o más posiciones terminales de la cadena principal. Un grupo heteroalquenilo puede referirse a un grupo que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o más heteroátomos en la cadena principal (“hetero-alquenilo de C<sub>2-10</sub>”). Un grupo heteroalquenilo puede tener de 2 a 9 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o más heteroátomos en la cadena principal (“hetero-alquenilo de C<sub>2-9</sub>”). Un grupo heteroalquenilo puede tener de 2 a 8 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o más heteroátomos en la cadena principal (“hetero-alquenilo de C<sub>2-8</sub>”). Un grupo heteroalquenilo puede tener de 2 a 7 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o más heteroátomos en la cadena principal (“hetero-alquenilo de C<sub>2-7</sub>”). Un grupo heteroalquenilo puede tener de 2 a 6 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o más heteroátomos en la cadena principal (“hetero-alquenilo de C<sub>2-6</sub>”). Un grupo heteroalquenilo puede tener de 2 a 5 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o 2 heteroátomos en la cadena principal (“hetero-alquenilo de C<sub>2-5</sub>”). Un grupo heteroalquenilo puede tener de 2 a 4 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o 2 heteroátomos en la cadena principal (“hetero-alquenilo de C<sub>2-4</sub>”). Un grupo heteroalquenilo puede tener de 2 a 3 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 heteroátomo en la cadena principal (“hetero-alquenilo de C<sub>2-3</sub>”). Un grupo heteroalquenilo puede tener de 2 a 6 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o 2 heteroátomos en la cadena principal (“hetero-alquenilo de C<sub>2-6</sub>”). A menos que se especifique lo contrario, cada aparición de un grupo heteroalquenilo está independientemente no sustituida (un “heteroalquenilo no sustituido”) o sustituida (un “heteroalquenilo sustituido”) con

uno o más sustituyentes. El grupo heteroalqueno puede ser un heteroalqueno de C<sub>2-10</sub> no sustituido. El grupo heteroalqueno puede ser un heteroalqueno de C<sub>2-10</sub> sustituido.

El término "heteroalquino" se refiere a un grupo alquino, que incluye además al menos un heteroátomo (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 heteroátomos) seleccionado de oxígeno, nitrógeno o azufre dentro de (por ejemplo, insertado entre átomos de carbono adyacentes de) y/o colocado en una o más posiciones terminales de la cadena principal. Un grupo heteroalquino puede referirse a un grupo que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, al menos un enlace triple y 1 o más heteroátomos en la cadena principal ("hetero-alquino de C<sub>2-10</sub>"). Un grupo heteroalquino puede tener de 2 a 9 átomos de carbono, al menos un enlace triple y 1 o más heteroátomos en la cadena principal ("hetero-alquino de C<sub>2-9</sub>"). Un grupo heteroalquino puede tener de 2 a 8 átomos de carbono, al menos un enlace triple y 1 o más heteroátomos en la cadena principal ("hetero-alquino de C<sub>2-8</sub>"). Un grupo heteroalquino puede tener de 2 a 7 átomos de carbono, al menos un enlace triple y 1 o más heteroátomos en la cadena principal ("hetero-alquino de C<sub>2-7</sub>"). Un grupo heteroalquino puede tener de 2 a 6 átomos de carbono, al menos un triple enlace y 1 o más heteroátomos en la cadena principal ("hetero-alquino de C<sub>2-6</sub>"). Un grupo heteroalquino puede tener de 2 a 5 átomos de carbono, al menos un enlace triple y 1 o 2 heteroátomos en la cadena principal ("hetero-alquino de C<sub>2-5</sub>"). Un grupo heteroalquino puede tener de 2 a 4 átomos de carbono, al menos un enlace triple y 1 o 2 heteroátomos en la cadena principal ("hetero-alquino de C<sub>2-4</sub>"). Un grupo heteroalquino puede tener de 2 a 3 átomos de carbono, al menos un enlace triple y 1 heteroátomo en la cadena principal ("hetero-alquino de C<sub>2-3</sub>"). Un grupo heteroalquino puede tener de 2 a 6 átomos de carbono, al menos un enlace triple y 1 o 2 heteroátomos en la cadena principal ("hetero-alquino de C<sub>2-6</sub>"). A menos que se especifique lo contrario, cada aparición de un grupo heteroalquino está independientemente no sustituida (un "heteroalquino no sustituido") o sustituida (un "heteroalquino sustituido") con uno o más sustituyentes. El grupo heteroalquino puede ser un heteroalquino de C<sub>2-10</sub> no sustituido. El grupo heteroalquino puede ser un heteroalquino de C<sub>2-10</sub> sustituido.

El término "carbociclilo" o "carbocíclico" se refiere a un radical de un grupo hidrocarbonado cíclico no aromático que tiene de 3 a 14 átomos de carbono anulares ("carbociclilo de C<sub>3-14</sub>") y cero heteroátomos en el sistema anular no aromático. Un grupo carbociclilo puede tener 3 a 10 átomos de carbono anulares ("carbociclilo de C<sub>3-10</sub>"). Un grupo carbociclilo puede tener 3 a 8 átomos de carbono anulares ("carbociclilo de C<sub>3-8</sub>"). Un grupo carbociclilo puede tener 3 a 7 átomos de carbono anulares ("carbociclilo de C<sub>3-7</sub>"). Un grupo carbociclilo puede tener 3 a 6 átomos de carbono anulares ("carbociclilo de C<sub>3-6</sub>"). Un grupo carbociclilo puede tener 4 a 6 átomos de carbono anulares ("carbociclilo de C<sub>4-6</sub>"). Un grupo carbociclilo puede tener 5 a 6 átomos de carbono anulares ("carbociclilo de C<sub>5-6</sub>"). Un grupo carbociclilo puede tener 5 a 10 átomos de carbono anulares ("carbociclilo de C<sub>5-10</sub>"). Grupos carbociclilo de C<sub>3-6</sub> ejemplares incluyen, sin limitación, ciclopropilo (C<sub>3</sub>), ciclopropenilo (C<sub>3</sub>), ciclobutilo (C<sub>4</sub>), ciclobutenilo (C<sub>4</sub>), ciclopentilo (C<sub>5</sub>), ciclopentenilo (C<sub>5</sub>), ciclohexilo (C<sub>6</sub>), ciclohexenilo (C<sub>6</sub>), ciclohexadienilo (C<sub>6</sub>), y similares. Grupos carbociclilo de C<sub>3-8</sub> ejemplares incluyen, sin limitación, los grupos carbociclilo de C<sub>3-6</sub> anteriormente mencionados, así como cicloheptilo (C<sub>7</sub>), cicloheptenilo (C<sub>7</sub>), cicloheptadienilo (C<sub>7</sub>), cicloheptatrienilo (C<sub>7</sub>), ciclooctilo (C<sub>8</sub>), ciclooctenilo (C<sub>8</sub>), biciclo[2.2.1]heptanilo (C<sub>7</sub>), biciclo[2.2.2]octanilo (C<sub>8</sub>), y similares. Grupos carbociclilo de C<sub>3-10</sub> ejemplares incluyen, sin limitación, los grupos carbociclilo de C<sub>3-8</sub> anteriormente mencionados, así como ciclononilo (C<sub>9</sub>), ciclononenilo (C<sub>9</sub>), ciclodecilo (C<sub>10</sub>), ciclodecenilo (C<sub>10</sub>), octahidro-1*H*-indenilo (C<sub>9</sub>), decahidronaftalenilo (C<sub>10</sub>), espiro[4.5]decanilo (C<sub>10</sub>), y similares. Como ilustran los ejemplos anteriores, el grupo carbociclilo puede ser monocíclico ("carbociclilo monocíclico") o policíclico (por ejemplo, que contiene un sistema anular condensado, con puente o espiro, tal como un sistema bicíclico ("carbociclilo bicíclico") o un sistema tricíclico ("carbociclilo tricíclico")), y puede estar saturado o puede contener uno o más enlaces dobles o triples carbono-carbono. "Carbociclilo" también incluye sistemas anulares en los que el anillo carbociclilo, como se define anteriormente, está condensado con uno o más grupos arilo o heteroarilo en los que el punto de unión está en el anillo carbociclilo y, en tales casos, el número de carbonos sigue designando el número de carbonos en el sistema anulars carbocíclicos. A menos que se especifique lo contrario, cada aparición de un grupo carbociclilo está independientemente no sustituida (un "carbociclilo no sustituido") o sustituida (un "carbociclilo sustituido") con uno o más sustituyentes. El grupo carbociclilo puede ser un carbociclilo de C<sub>3-14</sub> no sustituido. El grupo carbociclilo puede ser un carbociclilo de C<sub>3-14</sub> sustituido.

"Carbociclilo" puede ser un grupo carbociclilo saturado monocíclico que tiene de 3 a 14 átomos de carbono anulares ("cicloalquilo de C<sub>3-14</sub>"). Un grupo cicloalquilo puede tener 3 a 10 átomos de carbono anulares ("cicloalquilo de C<sub>3-10</sub>"). Un grupo cicloalquilo puede tener 3 a 8 átomos de carbono anulares ("cicloalquilo de C<sub>3-8</sub>"). Un grupo cicloalquilo puede tener 3 a 6 átomos de carbono anulares ("cicloalquilo de C<sub>3-6</sub>"). Un grupo cicloalquilo puede tener 4 a 6 átomos de carbono anulares ("cicloalquilo de C<sub>4-6</sub>"). Un grupo cicloalquilo puede tener 5 a 6 átomos de carbono anulares ("cicloalquilo de C<sub>5-6</sub>"). Un grupo cicloalquilo puede tener de 5 a 10 átomos de carbono anulares ("cicloalquilo de C<sub>5-10</sub>"). Ejemplos de grupos cicloalquilo de C<sub>5-6</sub> incluyen ciclopentilo (C<sub>5</sub>) y ciclohexilo (C<sub>5</sub>). Ejemplos de grupos cicloalquilo de C<sub>3-6</sub> incluyen los grupos cicloalquilo de C<sub>5-6</sub> anteriormente mencionados, así como ciclopropilo (C<sub>3</sub>) y ciclobutilo (C<sub>4</sub>). Ejemplos de grupos cicloalquilo de C<sub>3-8</sub> incluyen los grupos cicloalquilo de C<sub>3-6</sub> anteriormente mencionados, así como cicloheptilo (C<sub>7</sub>) y ciclooctilo (C<sub>8</sub>). A menos que se especifique lo contrario, cada aparición de un grupo cicloalquilo está independientemente no sustituida (un "cicloalquilo no sustituido") o sustituida (un "cicloalquilo sustituido") con uno o más sustituyentes. El grupo cicloalquilo puede ser un cicloalquilo de C<sub>3-14</sub> no sustituido. El grupo cicloalquilo puede ser un cicloalquilo de C<sub>3-14</sub> sustituido.

El término "heterociclilo" o "heterocíclico" se refiere a un radical de un sistema anular no aromático de 3 a 14 miembros que tiene átomos de carbono anulares y 1 a 4 heteroátomos anulares, en el que cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre ("heterociclilo de 3-14 miembros"). En los grupos heterociclilo que

contienen uno o más átomos de nitrógeno, el punto de unión puede ser un átomo de carbono o nitrógeno, según lo permita la valencia. Un grupo heterociclilo puede ser monocíclico ("heterociclilo monocíclico") o policíclico (por ejemplo, un sistema anular condensado, con puente o espiro, tal como un sistema bicíclico ("heterociclilo bicíclico") o un sistema tricíclico ("heterociclilo tricíclico")), y puede estar saturado o puede contener uno o más enlaces dobles o triples carbono-carbono. Los sistemas anulares policíclicos de heterociclilo pueden incluir uno o más heteroátomos en uno o ambos anillos. "Heterociclilo" también incluye sistemas anulares en los que el anillo heterociclilo, como se define anteriormente, está condensado con uno o más grupos carbociclilo en los que el punto de unión está en el anillo carbociclilo o heterociclilo, o sistemas anulares en los que el anillo heterociclilo, como se define anteriormente, está condensado con uno o más grupos arilo o heteroarilo, en los que el punto de unión está en el anillo heterociclilo, y en tales casos, el número de miembros anulares continúa designando el número de miembros anulares en el sistema anular heterociclilo. A menos que se especifique lo contrario, cada aparición de heterociclilo está independientemente no sustituida (un "heterociclilo no sustituido") o sustituida (un "heterociclilo sustituido") con uno o más sustituyentes. El grupo heterociclilo puede ser un heterociclilo de 3-14 miembros no sustituido. El grupo heterociclilo puede ser un heterociclilo de 3-14 miembros sustituido.

Un grupo heterociclilo puede ser un sistema anular no aromático de 5-10 miembros que tiene átomos de carbono anulares y 1-4 heteroátomos anulares, en el que cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre ("heterociclilo de 5-10 miembros"). Un grupo heterociclilo puede ser un sistema anular no aromático de 5-8 miembros que tiene átomos de carbono anulares y 1-4 heteroátomos anulares, en el que cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre ("heterociclilo de 5-8 miembros"). Un grupo heterociclilo puede ser un sistema anular no aromático de 5-6 miembros que tiene átomos de carbono anulares y 1-4 heteroátomos anulares, en el que cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre ("heterociclilo de 5-6 miembros"). El heterociclilo de 5-6 miembros tiene 1-3 heteroátomos anulares seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre. El heterociclilo de 5-6 miembros puede tener 1-2 heteroátomos anulares seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre. El heterociclilo de 5-6 miembros puede tener 1 heteroátomo anular seleccionado de nitrógeno, oxígeno y azufre.

Los ejemplos de grupos heterociclilo de 3 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, azirdinilo, oxiranilo y tiiranilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 4 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, azetidino, oxetanilo y tietanilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 5 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, tetrahidrofuranilo, dihidrofuranilo, tetrahidrotiofenilo, dihidrotiofenilo, pirrolidinilo, dihidropirrolilo y pirrolidinilo-2,5-diona. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 5 miembros que contienen 2 heteroátomos incluyen, sin limitación, dioxolanilo, oxatolanilo y ditiolanilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 5 miembros que contienen 3 heteroátomos incluyen, sin limitación, triazolinilo, oxadiazolinilo y tiadiazolinilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 6 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, piperidinilo, tetrahidropiranilo, dihidropiridinilo y tianilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 6 miembros que contienen 2 heteroátomos incluyen, sin limitación, piperazinilo, morfolinilo, ditiolanilo y dioxanilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 6 miembros que contienen 2 heteroátomos incluyen, sin limitación, triazinanilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 7 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, azepanilo, oxepanilo y tiepanilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 8 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, azocanilo, oxecanilo y tiocanilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo bicíclicos incluyen, sin limitación, indolinilo, isoindolinilo, dihidrobenzofuranilo, dihidrobenzotienilo, tetrahidrobenzotienilo, tetrahidrobenzofuranilo, tetrahidroindolinilo, tetrahidroquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, decahidroisoquinolinilo, octahidrocromenilo, octahidroisocromenilo, decahidronaftiridinilo, decahidro-1,8-naftiridinilo, octahidropirrolilo[3,2-b]pirrolilo, indolinilo, ftalimidilo, naftalimidilo, cromanilo, cromenilo, 1H-benzo[e][1,4]diazepinilo, 1,4,5,7-tetrahidropirano[3,4-b]pirrolilo, 5,6-dihidro-4H-furo[3,2-b]pirrolilo, 6,7-dihidro-5H-furo[3,2-b]piranilo, 5,7-dihidro-4H-tieno[2,3-c]piranilo, 2,3-dihidro-1H-pirrolilo[2,3-b]piridinilo, 2,3-dihidrofuro[2,3-b]piridinilo, 4,5,6,7-tetrahidro-1H-pirrolilo[2,3-b]piridinilo, 4,5,6,7-tetrahidrofuro[3,2-c]piridinilo, 4,5,6,7-tetrahidrotieno[3,2-b]piridinilo, 1,2,3,4-tetrahidro-1,6-naftiridinilo, y similares.

El término "arilo" se refiere a un radical de un sistema anular aromático monocíclico o policíclico (por ejemplo, bicíclico o tricíclico)  $4n+2$  (por ejemplo, que tiene 6, 10 o 14 electrones  $\pi$  compartidos en una matriz cíclica) que tiene 6-14 átomos de carbono anulares y cero heteroátomos provistos en el sistema anular aromático ("arilo de  $C_{6-14}$ "). Un grupo arilo puede tener 6 átomos de carbono anulares ("arilo de  $C_6$ "; por ejemplo, fenilo). Un grupo arilo puede tener 10 átomos de carbono anulares ("arilo de  $C_{10}$ "; por ejemplo naftilo tal como 1-naftilo y 2-naftilo). Un grupo arilo puede tener 14 átomos de carbono anulares ("arilo de  $C_{14}$ "; por ejemplo antracilo). "Arilo" también incluye sistemas anulares en los que el anillo arilo, como se define anteriormente, está condensado con uno o más grupos carbociclilo o heterociclilo en los que el radical o punto de unión está en el anillo arilo, y en tales casos, el número de átomos de carbono continúa designando el número de átomos de carbono en el sistema anular de arilo. A menos que se especifique lo contrario, cada aparición de un grupo arilo está independientemente no sustituida (un "arilo no sustituido") o sustituida (un "arilo sustituido") con uno o más sustituyentes. El grupo arilo puede ser un arilo de  $C_{6-14}$  no sustituido. El grupo arilo puede ser un arilo de  $C_{6-14}$  sustituido.

El término "heteroarilo" se refiere a un radical de un sistema anular aromático monocíclico o policíclico de 5-14 miembros (por ejemplo, bicíclico, tricíclico)  $4n+2$  (por ejemplo, que tienen 6, 10 o 14 electrones  $\pi$  compartidos en una matriz cíclica) que tiene átomos de carbono anulares y 1-4 heteroátomos anulares provistos en el sistema anular aromático, en el que cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre ("heteroarilo").

de 5-14 miembros"). En los grupos heteroarilo que contienen uno o más átomos de nitrógeno, el punto de unión puede ser un átomo de carbono o nitrógeno, según lo permita la valencia. Los sistemas anulares policíclicos de heteroarilo pueden incluir uno o más heteroátomos en uno o ambos anillos. "Heteroarilo" incluye sistemas anulares en los que el anillo de heteroarilo, como se define anteriormente, está condensado con uno o más grupos carbociclilo o heterociclilo en los que el punto de unión está en el anillo de heteroarilo, y en tales casos, el número de miembros anulares continúa designando el número de miembros anulares en el sistema anular de heteroarilo. "Heteroarilo" también incluye sistemas anulares en los que el anillo heteroarilo, como se define anteriormente, está condensado con uno o más grupos arilo en los que el punto de unión está en el anillo arilo o heteroarilo, y en tales casos, el número de miembros anulares designa el número de miembros anulares en el sistema anular policíclico condensado (arilo/heteroarilo).

Grupos heteroarilo policíclicos en los que un anillo no contiene un heteroátomo (por ejemplo, indolilo, quinolinilo, carbazolilo y similares) el punto de unión puede estar en cualquier anillo, es decir, ya sea el anillo que porta un heteroátomo (por ejemplo, 2-indolilo) o el anillo que no contiene un heteroátomo (por ejemplo, 5-indolilo).

Un grupo heteroarilo puede ser un sistema anular aromático de 5-10 miembros que tiene átomos de carbono anulares y 1-4 heteroátomos anulares provistos en el sistema anular aromático, en el que cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre ("heteroarilo de 5-10 miembros"). Un grupo heteroarilo puede ser un sistema anular aromático de 5-8 miembros que tiene átomos de carbono anulares y 1-4 heteroátomos anulares provistos en el sistema anular aromático, en el que cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre ("heteroarilo de 5-8 miembros"). Un grupo heteroarilo puede ser un sistema anular aromático de 5-6 miembros que tiene átomos de carbono anulares y 1-4 heteroátomos anulares provistos en el sistema anular aromático, en el que cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre ("heteroarilo de 5-6 miembros"). El heteroarilo de 5-6 miembros puede tener 1-3 heteroátomos anulares seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre. El heteroarilo de 5-6 miembros puede tener 1-2 heteroátomos anulares seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre. El heteroarilo de 5-6 miembros puede tener 1 heteroátomo anular seleccionado de nitrógeno, oxígeno y azufre. A menos que se especifique lo contrario, cada aparición de un grupo heteroarilo está independientemente no sustituida (un "heteroarilo no sustituido") o sustituida (un "heteroarilo sustituido") con uno o más sustituyentes. El grupo heteroarilo puede ser un heteroarilo de 5-14 miembros no sustituido. El grupo heteroarilo puede ser un heteroarilo de 5-14 miembros sustituido.

Los ejemplos de grupos heteroarilo de 5 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, pirrolilo, furanilo y tiofenilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo de 5 miembros que contienen 2 heteroátomos incluyen, sin limitación, imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo e isotiazolilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo de 5 miembros que contienen 3 heteroátomos incluyen, sin limitación, triazolilo, oxadiazolilo y tiadiazolilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo de 5 miembros que contienen 4 heteroátomos incluyen, sin limitación, tetrazolilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo de 6 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, piridinilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo de 6 miembros que contienen 2 heteroátomos incluyen, sin limitación, piridazinilo, pirimidinilo y pirazinilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo de 6 miembros que contienen 3 o 4 heteroátomos incluyen, sin limitación, triazinilo y tetrazinilo, respectivamente. Los ejemplos de grupos heteroarilo de 7 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, azepinilo, oxepinilo y tiepinilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo 5,6-bicíclico incluyen, sin limitación, indolilo, isoindolilo, indazolilo, benzotriazolilo, benzotiofenilo, isobenzotiofenilo, benzofuranilo, benzoisofuranilo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, bencisoxazolilo, benzoxadiazolilo, benzotiazolilo, bencisotiazolilo, benzotiadiazolilo, indolizínilo y purínilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo 6,6-bicíclico incluyen, sin limitación, naftiridinilo, pteridinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, cinolinilo, quinoxalinilo, ftalazinilo y quinazolinilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo tricíclico incluyen, sin limitación, fenantridinilo, dibenzofuranilo, carbazolilo, acridinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo y fenazinilo.

El término "insaturado" o "parcialmente insaturado" se refiere a un resto que incluye al menos un doble o triple enlace.

Añadir el sufijo "-eno" a un grupo indica que el grupo es un resto divalente, por ejemplo alquileo es el resto divalente de alquilo, alquilenilo es el resto divalente de alquénilo, alquinileno es el resto divalente de alquínilo, heteroalquileo es el resto divalente de heteroalquilo, heteroalquilenilo es el resto divalente de heteroalquénilo, heteroalquinileno es el resto divalente de heteroalquínilo, carbociclieno es el resto divalente de carbociclilo, heterociclieno es el resto divalente de heterociclilo, arileno es el resto divalente de arilo, y heteroarileno es el resto divalente de heteroarilo.

Un grupo está opcionalmente sustituido a menos que se indique expresamente lo contrario. Los grupos alquilo, alquénilo, alquínilo, heteroalquilo, heteroalquénilo, heteroalquínilo, carbociclilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos. "Opcionalmente sustituido" se refiere a un grupo que puede estar sustituido o no sustituido (por ejemplo, grupo alquilo "sustituido" o "no sustituido", alquénilo "sustituido" o "no sustituido", alquínilo "sustituido" o "no sustituido", heteroalquilo "sustituido" o "no sustituido", heteroalquénilo "sustituido" o "no sustituido", heteroalquínilo "sustituido" o "no sustituido", carbociclilo "sustituido" o "no sustituido", heterociclilo "sustituido" o "no sustituido", arilo "sustituido" o "no sustituido", o heteroarilo "sustituido" o "no sustituido"). En general, el término "sustituido" significa que al menos un hidrógeno presente en un grupo se reemplaza por un sustituyente permisible, por ejemplo un sustituyente que tras la sustitución da como resultado un compuesto estable, por ejemplo un compuesto que no experimenta una transformación espontánea tal como por reordenamiento, ciclización, eliminación u otra reacción. A menos que se indique lo contrario, un grupo "sustituido" tiene un sustituyente en una o más posiciones sustituibles del grupo, y cuando se sustituye más de una posición en cualquier estructura dada, el sustituyente es el mismo o diferente en cada posición. Se contempla que el término "sustituido" incluya la sustitución con todos los

sustituyentes permisibles de los compuestos orgánicos, e incluye cualquiera de los sustituyentes descritos aquí que dé como resultado la formación de un compuesto estable. La presente descripción contempla todas y cada una de dichas combinaciones para llegar a un compuesto estable. Para los fines de esta descripción, los heteroátomos tal como el nitrógeno pueden tener sustituyentes de hidrógeno y/o cualquier sustituyente adecuado como se describe aquí que satisfaga las valencias de los heteroátomos y dé como resultado la formación de un resto estable. No se pretende que la descripción esté limitada de ninguna manera por los sustituyentes ejemplares descritos aquí.

El término "halo" o "halógeno" se refiere al flúor (fluoro, -F), cloro (cloro, -Cl), bromo (bromo, -Br) o yodo (yodo, -I).

El término "amino" se refiere al grupo -NH<sub>2</sub>. El término "amino sustituido", por extensión, se refiere a un amino monosustituido, un amino disustituido o un amino trisustituido. El "amino sustituido" puede ser un grupo amino monosustituido o amino disustituido.

La expresión "amino monosustituido" se refiere a un grupo amino en el que el átomo de nitrógeno unido directamente a la molécula original está sustituido con un hidrógeno y un grupo distinto del hidrógeno, e incluye grupos seleccionados de -NH(R<sup>bb</sup>), -NHC(=O)R<sup>aa</sup>, -NHCO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -NHC(=O)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -NHC(=NR<sup>bb</sup>)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -NHSO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -NHP(=O)(OR<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, y -NHP(=O)(NR<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, en los que R<sup>aa</sup>, R<sup>bb</sup> y R<sup>cc</sup> son como se definen aquí, y en los que R<sup>bb</sup> del grupo -NH(R<sup>bb</sup>) no es hidrógeno.

La expresión "amino disustituido" se refiere a un grupo amino en el que el átomo de nitrógeno unido directamente a la molécula original está sustituido con dos grupos distintos del hidrógeno, e incluye grupos seleccionados de -N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>bb</sup>C(=O)R<sup>aa</sup>, -NR<sup>bb</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -NR<sup>bb</sup>C(=O)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>bb</sup>C(=NR<sup>bb</sup>)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>bb</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -NR<sup>bb</sup>P(=O)(OR<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, y -NR<sup>bb</sup>P(=O)(NR<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, en los que R<sup>aa</sup>, R<sup>bb</sup> y R<sup>cc</sup> son como se definen aquí, con la condición de que el átomo de nitrógeno unido directamente a la molécula original no esté sustituido con hidrógeno.

La expresión "amino trisustituido" se refiere a un grupo amino en el que el átomo de nitrógeno unido directamente a la molécula original está sustituido con tres grupos, e incluye grupos seleccionados de -N(R<sup>bb</sup>)<sub>3</sub> y -N(R<sup>bb</sup>)<sub>3</sub><sup>+</sup>X<sup>-</sup>, en los que R<sup>bb</sup> y X<sup>-</sup> son como se definen aquí.

El sustituyente presente en el átomo de nitrógeno puede ser un grupo protector de nitrógeno (también denominado aquí "grupo protector de amino"). Los grupos protectores de nitrógeno incluyen, pero no se limitan a, grupos -OH, -OR<sup>aa</sup>, -N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -C(=O)R<sup>aa</sup>, -C(=O)N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -C(=NR<sup>cc</sup>)R<sup>aa</sup>, -C(=NR<sup>cc</sup>)OR<sup>aa</sup>, -C(=NR<sup>cc</sup>)N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>R<sup>cc</sup>, -SO<sub>2</sub>OR<sup>cc</sup>, -SOR<sup>aa</sup>, -C(=S)N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -C(=O)SR<sup>cc</sup>, -C(=S)SR<sup>cc</sup>, alquilo de C<sub>1-10</sub> (por ejemplo, aralquilo, heteroaralquilo), alquenilo de C<sub>2-10</sub>, alquinilo de C<sub>2-10</sub>, hetero-alquilo de C<sub>1-10</sub>, hetero-alquenilo de C<sub>2-10</sub>, hetero-alquinilo de C<sub>2-10</sub>, carbociclilo de C<sub>3-10</sub>, heterociclilo de 3-14 miembros, arilo de C<sub>6-14</sub> y heteroarilo de 5-14 miembros, en los que cada alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, carbociclilo, heterociclilo, aralquilo, arilo y heteroarilo está sustituido independientemente con 0, 1, 2, 3, 4 o 5 grupos R<sup>dd</sup>, y en los que R<sup>aa</sup>, R<sup>bb</sup>, R<sup>cc</sup> y R<sup>dd</sup> son como se definen aquí. Los grupos protectores de nitrógeno son bien conocidos en la técnica, e incluyen los descritos en detalle Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3<sup>a</sup> edición, John Wiley & Sons, 1999.

Por ejemplo, los grupos protectores de nitrógeno tales como grupos amida (por ejemplo, -C(=O)R<sup>aa</sup>) incluyen, pero no se limitan a, formamida, acetamida, cloroacetamida, tricloroacetamida, trifluoroacetamida, fenilacetamida, 3-fenilpropanamida, picolinamida, 3-piridilcarboxamida, derivado de *N*-benzoilfenilalanilo, benzamida, *p*-fenilbenzamida, *o*-nitrofenilacetamida, *o*-nitrofenoxiacetamida, acetoacetamida, (N'-ditiobenciloxiacilamino)acetamida, 3-(*p*-hidroxifenil)propanamida, 3-(*o*-nitrofenil)propanamida, 2-metil-2-(*o*-nitrofenoxi)propanamida, 2-metil-2-(*o*-fenilazofenoxi)propanamida, 4-clorobutanamida, 3-metil-3-nitrobutanamida, *o*-nitrocinnamida, derivado de *N*-acetilmetionina, *o*-nitrobenzamida y *o*-(benzoiloximetil)benzamida.

Grupos protectores de nitrógeno tales como grupos carbamato (por ejemplo, -C(=O)OR<sup>aa</sup>) incluyen, pero no se limitan a, carbamato de metilo, carbamato de etilo, carbamato de 9-fluorenilmetilo (Fmoc), carbamato de 9-(2-sulfo)fluorenilmetilo, carbamato de 9-(2,7-dibromo)fluorenilmetilo, carbamato de 2,7-di-*t*-butil[9-(10,10-dioxo-10,10,10-tetrahidrotioxantil)]metilo (DBD-Tmoc), carbamato de 4-metoxifenacilo (Phenoc), carbamato de 2,2,2-tricloroetilo (Troc), carbamato de 2-trimetilsililetilo (Teoc), carbamato de 2-feniletilo (hZ), carbamato de 1-(1-adamantil)-1-metiletilo (Adpoc), carbamato de 1,1-dimetil-2-haloetilo, carbamato de 1,1-dimetil-2,2-dibromoetilo (DB-*t*-BOC), carbamato de 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetilo (TBOC), carbamato de 1-metil-1-(4-bifenilil)etilo (Bpoc), carbamato de 1-(3,5-di-*t*-butilfenil)-1-metiletilo (*t*-Bumeoc), carbamato de 2-(2'- y 4'-piridil)etilo (Pyoc), carbamato de 2-(*N,N*-diciclohexilcarboxamido)etilo, carbamato de *t*-butilo (BOC o Boc), carbamato de 1-adamantilo (Adoc), carbamato de vinilo (Voc), carbamato de alilo (Alloc), carbamato de 1-isopropilalilo (Ipaoc), carbamato de cinamilo (Coc), carbamato de 4-nitrocinnamilo (Noc), carbamato de 8-quinolilo, carbamato de *N*-hidroxipiperidinilo, carbamato de alquilditio, carbamato de bencilo (Cbz), carbamato de *p*-metoxibencilo (Moz), carbamato de *p*-nitrobencilo, carbamato de *p*-bromobencilo, carbamato de *p*-clorobencilo, carbamato de 2,4-diclorobencilo, carbamato de 4-metilsulfonilbencilo (MsZ), carbamato de 9-antrilmetilo, carbamato de difenilmetilo, carbamato de 2-metiltioetilo, carbamato de 2-metilsulfoniletilo, carbamato de 2-(*p*-toluenosulfonil)etilo, carbamato de [2-(1,3-ditianil)]metilo (Dmoc), carbamato de 4-metiltiofenilo (Mtpc), carbamato de 2,4-dimetiltiofenilo (Bmpc), carbamato de 2-fosfonioetilo (Peoc), carbamato de 2-trifenilfosfonioisopropilo (Ppoc), carbamato de 1,1-dimetil-2-cianoetilo, carbamato de *m*-cloro-*p*-aciloxibencilo, carbamato de *p*-(dihidroxiboril)bencilo, carbamato de 5-bencisoxazolilmetilo, carbamato de 2-(trifluorometil)-6-

cromonilmetilo (Tcroc), carbamato de m-nitrofenilo, carbamato de 3,5-dimetoxibencilo, carbamato de o-nitrobencilo, carbamato de 3,4-dimetoxi-6-nitrobencilo, carbamato de fenil(o-nitrofenil)metilo, carbamato de *t*-amilo, tiocarbamato de S-bencilo, carbamato de *p*-cianobencilo, carbamato de ciclobutilo, carbamato de ciclohexilo, carbamato de ciclopentilo, carbamato de ciclopropilmetilo, carbamato de *p*-deciloxibencilo, carbamato de 2,2-dimetoxiacilvinilo, carbamato de *o*-(*N,N*-dimetilcarboxamido)bencilo, carbamato de 1,1-dimetil-3-(*N,N*-dimetilcarboxamido)propilo, carbamato de 1,1-dimetilpropinilo, carbamato de di(2-piridil)metilo, carbamato de 2-furanilmetilo, carbamato de 2-yodoetilo, carbamato de isoborinilo, carbamato de isobutilo, carbamato de isonicotinilo, carbamato de *p*-(*p*'-metoxifenilazo)bencilo, carbamato de 1-metilciclobutilo, carbamato de 1-metilciclohexilo, carbamato de 1-metil-1-ciclopropilmetilo, carbamato de 1-metil-1-(3,5-dimetoxifenil)etilo, carbamato de 1-metil-1-(*p*-fenilazofenil)etilo, carbamato de 1-metil-1-feniletilo, carbamato de 1-metil-1-(4-piridil)etilo, carbamato de fenilo, carbamato de *p*-(fenilazo)bencilo, carbamato de 2,4,6-tri-*t*-butilfenilo, carbamato de 4-(trimetilamonio)bencilo, y carbamato de 2,4,6-trimetilbencilo.

Grupos protectores de nitrógeno tales como grupos sulfonamida (por ejemplo, -S(=O)<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>) incluyen, pero no se limitan a, *p*-toluenosulfonamida (Ts), bencenosulfonamida, 2,3,6-trimetil-4-metoxibencenosulfonamida (Mtr), 2,4,6-trimetoxibencenosulfonamida (Mtb), 2,6-dimetil-4-metoxibencenosulfonamida (Pme), 2,3,5,6-tetrametil-4-metoxibencenosulfonamida (Mte), 4-metoxibencenosulfonamida (Mbs), 2,4,6-trimetilbencenosulfonamida (Mts), 2,6-dimetoxi-4-metilbencenosulfonamida (iMds), 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonamida (Pmc), metanosulfonamida (Ms), β-trimetilsililetanosulfonamida (SES), 9-antracenosulfonamida, 4-(4',8'-dimetoxinaftilmetil)bencenosulfonamida (DNMBS), bencilsulfonamida, trifluorometilsulfonamida, y fenacilsulfonamida.

Otros grupos protectores de nitrógeno incluyen, pero no se limitan a, derivado de fenotiazinil-(10)-acilo, derivado de *N*'-*p*-toluenosulfonilaminoacilo, derivado de *N*'-fenilaminotioacilo, derivado de *N*-benzoilfenilalanilo, derivado de *N*-acetilmetionina, 4,5-difenil-3-oxazolin-2-ona, *N*-ftalimida, *N*-ditiassuccinimida (Dts), *N*-2,3-difenilmaleimida, *N*-2,5-dimetilpirrol, aducto de *N*-1,1,4,4-tetrametildisililazaciclopentano (STABASE), 1,3-dimetil-1,3,5-triazaciclohexan-2-ona 5-sustituida, 1,3-dibencil-1,3,5-triazaciclohexan-2-ona 5-sustituida, 3,5-dinitro-4-piridona 1-sustituida, *N*-metilamina, *N*-[2-(trimetilsilil)etoxi]metilamina (SEM), *N*-3-acetoxipropilamina, *N*-(1-isopropil-4-nitro-2-oxo-3-pirrolin-3-il)amina, sales de amonio cuaternario, *N*-bencilamina, *N*-di(4-metoxifenil)metilamina, *N*-5-dibenzosuberilamina, *N*-trifenilmetilamina (Tr), *N*-[(4-metoxifenil)difenilmetil]amina (MMTr), *N*-9-fenilfluorenilamina (PhF), *N*-2,7-dicloro-9-fluorenilmetilenamina, *N*-ferrocenilmetilamino (Fcm), *N*'-óxido de *N*-2-picolilamino, *N*-1,1-dimetiltiometilenamina, *N*-bencilidenamina, *N*-*p*-metoxibencilidenamina, *N*-difenilmetilenamina, *N*-[(2-piridil)mesitil]metilenamina, *N*-(*N*',*N*'-dimetilaminometil)amina, *N*,*N*'-isopropilidendiamina, *N*-*p*-nitrobencilidenamina, *N*-salicilidenamina, *N*-5-clorosalicilidenamina, *N*-(5-cloro-2-hidroxifenil)fenilmetilenamina, *N*-ciclohexilidenamina, *N*-(5,5-dimetil-3-oxo-1-ciclohexenil)amina, derivado de N-borano, derivado de ácido *N*-difenilborínico, *N*-[fenil(pentaacilcromo- o volframio)acil]amina, quelato de N-cobre, quelato de *N*-zinc, *N*-nitroamina, *N*-nitrosoamina, *N*-óxido de amina, difenilfosfinamida (Dpp), dimetiltiofosfinamida (Mpt), difeniltiofosfinamida (Ppt), fosforamidatos de dialquilo, fosforamidato de dibencilo, fosforamidato de difenilo, bencenosulfenamida, o-nitrobencenosulfenamida (Nps), 2,4-dinitrobencenosulfenamida, pentaclorobencenosulfenamida, 2-nitro-4-metoxibencenosulfenamida, trifenilmetilsulfenamida, y 3-nitropiridinsulfenamida (Npys).

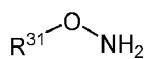
El sustituyente presente en un átomo de oxígeno puede ser un grupo protector de oxígeno (también denominado aquí "grupo protector de hidroxilo"). Los grupos protectores de oxígeno incluyen, pero no se limitan a, -R<sup>aa</sup>, -N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -C(=O)SR<sup>aa</sup>, -C(=O)R<sup>aa</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -C(=O)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -C(=NR<sup>bb</sup>)R<sup>aa</sup>, -C(=NR<sup>bb</sup>)OR<sup>aa</sup>, -C(=NR<sup>bb</sup>)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -S(=O)R<sup>aa</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -Si(R<sup>aa</sup>)<sub>3</sub>, -P(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -P(R<sup>cc</sup>)<sub>3</sub>, -P(=O)<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -P(=O)(R<sup>aa</sup>)<sub>2</sub>, -P(=O)(OR<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -P(=O)<sub>2</sub>N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, y -P(=O)(NR<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, en los que R<sup>aa</sup>, R<sup>bb</sup> y R<sup>cc</sup> son como se definen aquí. Los grupos protectores de oxígeno son bien conocidos en la técnica, e incluyen los descritos en detalle en Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene y P. G. M. Wuts, 3ª edición, John Wiley & Sons, 1999.

Los ejemplos de grupos protectores de oxígeno incluyen, pero no se limitan, metilo, metoxilmetilo (MOM), metiltiometilo (MTM), *t*-butiltiometilo, (fenildimetilsilil)metoximetilo (SMOM), benciloximetilo (BOM), *p*-metoxibenciloximetilo (PMBM), (4-metoxifenoxi)metilo (*p*-AOM), guayacolmetilo (GUM), *t*-butoximetilo, 4-penteniloximetilo (POM), siloximetilo, 2-metoxietoximetilo (MEM), 2,2,2-tricloroetoximetilo, bis(2-cloroetoxi)metilo, 2-(trimetilsilil)etoximetilo (SEMOR), tetrahidropiranilo (THP), 3-bromotetrahidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, 1-metoxiciclohexilo, 4-metoxitetrahidropiranilo (MTHP), 4-metoxitetrahidrotiopiranilo, S,S-dióxido de 4-metoxitetrahidrotiopiranilo, 1-[(2-cloro-4-metil)fenil]-4-metoxipiperidin-4-ilo (CTMP), 1,4-dioxan-2-ilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofuranilo, 2,3,3a,4,5,6,7,7a-octahidro-7,8,8-trimetil-4,7-metanobenzofuran-2-ilo, 1-etoxietilo, 1-(2-cloroetoxi)etilo, 1-metil-1-metoxietilo, 1-metil-1-benciloxietilo, 1-metil-1-benciloxi-2-fluoroetilo, 2,2,2-tricloroetilo, 2-trimetilsililetilo, 2-(fenilselenil)etilo, *t*-butilo, alilo, *p*-clorofenilo, *p*-metoxifenilo, 2,4-dinitrofenilo, bencilo (Bn), *p*-metoxibencilo, 3,4-dimetoxibencilo, o-nitrobencilo, *p*-nitrobencilo, *p*-halobencilo, 2,6-diclorobencilo, *p*-cianobencilo, *p*-fenilbencilo, 2-picolilo, 4-picolilo, *N*-óxido de 3-metil-2-picolilo, difenilmetilo, *p,p'*-dinitrobenzidrido, 5-dibenzosuberilo, trifenilmetilo, α-naftildifenilmetilo, *p*-metoxifenildifenilmetilo, di(*p*-metoxifenil)fenilmetilo, tri(*p*-metoxifenil)metilo, 4-(4'-bromofenaciloxifenil)difenilmetilo, 4,4',4"-tris(4,5-dicloroftalimidofenil)metilo, 4,4',4"-tris(levulinoiloxifenil)metilo, 4,4',4"-tris(benzoiloxifenil)metilo, 3-(imidazol-1-il)bis(4',4"-dimetoxifenil)metilo, 1,1-bis(4-metoxifenil)-1'-pirenilmetilo, 9-antrilo, 9-(9-fenil)xantenilo, 9-(9-fenil-10-oxo)antrilo, 1,3-benzoditiolan-2-ilo, S,S-dióxido de bencisotiazolilo, trimetilsililo (TMS), trietilsililo (TES), triisopropilsililo (TIPS), dimetilisopropilsililo (IPDMS), dietilisopropilsililo (DEIPS), dimetilhexilsililo, *t*-butildimetilsililo (TBDMS), *t*-butildifenilsililo (TBDPS), tribencilsililo, tri-*p*-xililsililo, trifenilsililo, difenilmetilsililo (DPMS), *t*-

butilmtoxifenilsililo (TBMPS), formato, benzoilformato, acetato, cloroacetato, dicloroacetato, tricloroacetato, trifluoroacetato, metoxiacetato, trifenilmetoxiacetato, fenoxiacetato, *p*-clorofenoxiacetato, 3-fenilpropionato, 4-oxopentanoato (levulinato), 4,4-(etilenoditio)pentanoato (levulinoiditioacetato), pivaloato, adamantato, crotonato, 4-metoxicrotonato, benzoato, *p*-fenilbenzoato, 2,4,6-trimetilbenzoato (mesitoato), metilcarbonato, 9-fluorenilmetilcarbonato (Fmoc), etilcarbonato, 2,2,2-tricloroetilcarbonato (Troc), 2-(trimetilsilil)etilcarbonato (TMSEC), 2-(fenilsulfonil)etilcarbonato (Psec), 2-(trifenilfosfonio)etilcarbonato (Peoc), isobutilcarbonato, vinilcarbonato, alilcarbonato, *t*-butilcarbonato (BOC or Boc), *p*-nitrofenilcarbonato, bencilcarbonato, *p*-metoxibencilcarbonato, 3,4-dimetoxibencilcarbonato, *o*-nitrobencilcarbonato, *p*-nitrobencilcarbonato, *S*-benciltiocarbonato, 4-etoxi-1-naftilcarbonato, metilditiocarbonato, 2-yodobenzoato, 4-azidobutirato, 4-nitro-4-metilpentanoato, *o*-(dibromometil)benzoato, 2-formilbencenosulfonato, 2-(metiltiometoxi)etilo, 4-(metiltiometoxi)butirato, 2-(metiltiometoximetil)benzoato, 2,6-dicloro-4-metilfenoxiacetato, 2,6-dicloro-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenoxiacetato, 2,4-bis(1,1-dimetilpropil)fenoxiacetato, clorodifenilacetato, isobutirato, monosuccinato, (E)-2-metil-2-butenato, *o*-(metoxiacil)benzoato,  $\alpha$ -naftoato, nitrato, alquilo *N,N,N',N'*-tetrametilfosforodiamidato, *N*-fenilcarbamato de alquilo, borato, dimetilfosfotioilo, 2,4-dinitrofenilsulfenato de alquilo, sulfato, metanosulfonato (mesilato), bencilsulfonato, y tosilato (Ts).

El sustituyente presente en un átomo de azufre puede ser un grupo protector de azufre (también denominado "grupo protector de tiol"). Los grupos protectores de azufre incluyen, pero no se limitan a,  $-R^{aa}$ ,  $-N(R^{bb})_2$ ,  $-C(=O)SR^{aa}$ ,  $-C(=O)R^{aa}$ ,  $-CO_2R^{aa}$ ,  $-C(=O)N(R^{bb})_2$ ,  $-C(=NR^{bb})R^{aa}$ ,  $-C(=NR^{bb})OR^{aa}$ ,  $-C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$ ,  $-S(=O)R^{aa}$ ,  $-SO_2R^{aa}$ ,  $-Si(R^{aa})_3$ ,  $-P(R^{cc})_2$ ,  $-P(R^{cc})_3$ ,  $-P(=O)_2R^{aa}$ ,  $-P(=O)(R^{aa})_2$ ,  $-P(=O)(OR^{cc})_2$ ,  $-P(=O)_2N(R^{bb})_2$ , y  $-P(=O)(NR^{bb})_2$ , en los que  $R^{aa}$ ,  $R^{bb}$  y  $R^{cc}$  son como se definen aquí. Los grupos protectores de azufre son bien conocidos en la técnica, e incluyen los descritos en detalle en Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene y P. G. M. Wuts, 3ª edición, John Wiley & Sons, 1999.

Los términos "aminooxi" o "grupo aminooxi" se usan indistintamente aquí, y se refieren a grupos funcionales que tienen la fórmula general:



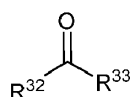
en la que  $R^{31}$  es alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclilo opcionalmente sustituido.  $R^{31}$  puede ser un aminoácido, en el que el punto de unión para el oxígeno está en la cadena lateral del aminoácido. El aminoácido puede estar dentro de un polipéptido.

Los términos "tautómeros" o "tautomérico" se refiere a dos o más compuestos interconvertibles resultantes de al menos una migración formal de un átomo de hidrógeno y al menos un cambio de valencia (por ejemplo, un enlace sencillo a un enlace doble, un enlace triple a un enlace sencillo, o viceversa). La relación exacta de los tautómeros depende de varios factores, incluidos la temperatura, el disolvente y el pH. Las tautomerizaciones (es decir, la reacción que proporciona un par tautomérico) pueden ser catalizadas por ácidos o bases. Las tautomerizaciones ejemplares incluyen tautomerizaciones ceto a enol, amida a imida, lactama a lactima, enamina a imina y enamina a (una enamina diferente).

También debe entenderse que los compuestos que tienen la misma fórmula molecular pero difieren en la naturaleza o secuencia de enlace de sus átomos o en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "isómeros". Los isómeros que difieren en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "estereoisómeros".

Los estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí se denominan "diastereómeros", y los que son imágenes especulares no superponibles entre sí se denominan "enantiómeros". Cuando un compuesto tiene un centro asimétrico, por ejemplo está enlazado a cuatro grupos diferentes, es posible un par de enantiómeros. Un enantiómero se puede caracterizar por la configuración absoluta de su centro asimétrico y se describe mediante las reglas de secuenciación R y S de Cahn y Prelog, o por la forma en que la molécula gira el plano de la luz polarizada y se designa como dextrorrotatoria o levorrotatoria (es decir, como (+) o (-)-isómeros respectivamente). Un compuesto quiral puede existir como enantiómero individual o como una mezcla de los mismos. Una mezcla que contiene proporciones iguales de los enantiómeros se denomina "mezcla racémica".

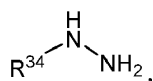
Los términos "carbonilo" o "grupo carbonilo" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a grupos funcionales compuestos por un átomo de carbono con doble enlace a cualquier átomo de oxígeno. Los carbonilos tienen la fórmula general:



en la que cada uno de  $R^{32}$  y  $R^{33}$  representa independientemente hidroxilo, amino opcionalmente sustituido, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclilo opcionalmente sustituido. Los ejemplos de carbonilos incluyen, pero no se

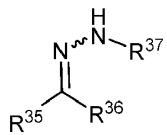
limitan, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, enonas, haluros de acilo, anhídridos de ácido, e imidas. Un compuesto que contiene carbonilo puede referirse a un compuesto que tiene un grupo aldehído, o un compuesto capaz de formar un grupo aldehído a través de la isomerización. Por ejemplo, ciertos azúcares (por ejemplo, azúcares reductores) tal como glucosa forman aldehídos a través de la isomerización. Un azúcar se clasifica como azúcar reductor si tiene una forma de cadena abierta con un grupo aldehído o un grupo hemiacetal libre. Los monosacáridos que contienen un grupo aldehído se conocen como aldosas, y los que tienen un grupo cetona se conocen como cetosas. El aldehído se puede oxidar mediante una reacción redox en la que se reduce otro compuesto. Así, un azúcar reductor es aquel que es capaz de reducir ciertas sustancias químicas. Los azúcares con grupos cetona en su forma de cadena abierta son capaces de isomerizarse a través de una serie de cambios tautoméricos para producir un grupo aldehído en disolución. Por lo tanto, los azúcares que portan cetona, tal como fructosa, se consideran azúcares reductores, pero es el isómero que contiene un grupo aldehído el que es reductor, ya que las cetonas no se pueden oxidar sin la descomposición del azúcar. Este tipo de isomerización es catalizada por la base presente en disoluciones que prueban la presencia de aldehídos.

El término “hidrazida”, como se usa aquí, se refiere a grupos funcionales que tienen la fórmula general:

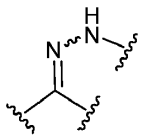


en la que  $\text{R}^{34}$  es alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclilo opcionalmente sustituido.  $\text{R}^{34}$  puede ser un aminoácido, en el que el punto de unión para el oxígeno está en la cadena lateral del aminoácido. El aminoácido puede estar dentro de un polipéptido.

El término “hidrazona”, como se usa aquí, se refiere a un compuesto que tiene la fórmula general:



en la que cada uno de  $\text{R}^{35}$ ,  $\text{R}^{36}$  y  $\text{R}^{37}$  es independientemente alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclilo opcionalmente sustituido. La expresión “enlace de hidrazona”, como se usa aquí, se refiere a la fórmula:



Las hidrazonas pueden prepararse, por ejemplo, a partir de la unión de un compuesto que comprende un grupo hidrazida y un compuesto que comprende un carbonilo.

El término “acilo”, como se usa aquí, es un subconjunto de un grupo alquilo sustituido, y se refiere a un grupo que tiene la fórmula general  $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{A}}$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^{\text{A}}$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{A}}$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{SR}^{\text{A}}$ , o  $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{A}})_2$ , en la que cada aparición de  $\text{R}^{\text{A}}$  es independientemente hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclilo opcionalmente sustituido. Los grupos acilo ejemplares incluyen aldehídos ( $-\text{CHO}$ ), ácidos carboxílicos ( $-\text{CO}_2\text{H}$ ), cetonas, haluros de acilo, ésteres, amidas, iminas, carbonatos, carbamatos, y ureas. Los sustituyentes acilo incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los sustituyentes descritos aquí, que dan como resultado la formación de un resto estable.

El término “azida” o “azido”, como se usa aquí, se refiere a un grupo de fórmula  $(-\text{N}_3)$ .

Las definiciones de grupos funcionales específicos y términos químicos se describen con más detalle a continuación. Los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla Periódica de los Elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75ª Ed., cubierta interior, y los grupos funcionales específicos se definen generalmente como se describe allí. Además, los principios generales de la química orgánica, así como los restos funcionales específicos y la reactividad, se describen en Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999; Smith y March March's Advanced Organic Chemistry, 5ª edición, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2001; Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, Inc., Nueva York, 1989; y Carruthers, Some Modern Methods of Organic Synthesis, 3ª edición, Cambridge University Press, Cambridge, 1987.

Los compuestos descritos aquí pueden comprender uno o más centros asimétricos, y por lo tanto pueden existir en diversas formas estereoisómeras, por ejemplo enantiómeros y/o diastereómeros. Por ejemplo, los compuestos descritos aquí pueden estar en forma de un enantiómero, diastereómero o isómero geométrico individual, o pueden

estar en forma de una mezcla de estereoisómeros, incluidas mezclas racémicas y mezclas enriquecidas en uno o más estereoisómeros. Los isómeros se pueden aislar de mezclas mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen cromatografía de líquidos de alta presión quiral (HPLC) y la formación y cristalización de sales quirales; o los isómeros preferidos pueden prepararse mediante síntesis asimétrica. Véanse, por ejemplo Jacques et al., *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley Interscience, Nueva York, 1981); Wilen et al., *Tetrahedron* 33:2725 (1977); Eliel, E.L. *Stereochemistry of Carbon Compounds* (McGraw-Hill, NY, 1962); y Wilen, S.H. *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions* p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972). La descripción abarca adicionalmente compuestos como isómeros individuales sustancialmente libres de otros isómeros, y alternativamente, como mezclas de diversos isómeros.

10 En una fórmula, --- está ausente, es un enlace de coordinación entre un ligando y un metal, o es un enlace sencillo.

Quando se enumera un intervalo de valores, se pretende abarcar cada valor y subintervalo dentro del intervalo. Por ejemplo "alquilo de C<sub>1-6</sub>" pretende abarcar alquilo de C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>1-6</sub>, C<sub>1-5</sub>, C<sub>1-4</sub>, C<sub>1-3</sub>, C<sub>1-2</sub>, C<sub>2-6</sub>, C<sub>2-5</sub>, C<sub>2-4</sub>, C<sub>2-3</sub>, C<sub>3-6</sub>, C<sub>3-5</sub>, C<sub>3-4</sub>, C<sub>4-6</sub>, C<sub>4-5</sub>, y C<sub>5-6</sub>.

15 El término "alifático", como se usa aquí, incluye hidrocarburos tanto saturados como insaturados, no aromáticos, de cadena lineal (es decir, no ramificados), ramificados, acíclicos y cíclicos (es decir, carbocíclicos), que están opcionalmente sustituidos con uno o más grupos funcionales. Como apreciará un experto normal en la técnica, "alifático" pretende incluir aquí, pero no se limita a, restos alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, y cicloalquino. Por lo tanto, como se usa aquí, el término "alquilo" incluye grupos alquilo lineales, ramificados y cíclicos. Se aplica una convención análoga a otros términos genéricos tales como "alqueno", "alquino", y similares. Además, como se usa aquí, los términos "alquilo", "alqueno", "alquino", y similares abarcan tanto grupos sustituidos como no sustituidos. Como se usa aquí, "alifático" se usa para indicar aquellos grupos alifáticos (cíclicos, acíclicos, sustituidos, no sustituidos, ramificados o no ramificados) que tienen 1-20 átomos de carbono (C<sub>1-20</sub> alifático). El grupo alifático puede tener 1-10 átomos de carbono (C<sub>1-10</sub> alifático). El grupo alifático puede tener 1-6 átomos de carbono (C<sub>1-6</sub> alifático). El grupo alifático puede tener 1-5 átomos de carbono (C<sub>1-5</sub> alifático). El grupo alifático puede tener 1-4 átomos de carbono (C<sub>1-4</sub> alifático). El grupo alifático puede tener 1-3 átomos de carbono (C<sub>1-3</sub> alifático). El grupo alifático puede tener 1-2 átomos de carbono (C<sub>1-2</sub> alifático). Los sustituyentes del grupo alifático incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los sustituyentes descritos aquí, que dan como resultado la formación de un resto estable.

20 El término "heteroalifático", como se usa aquí, se refiere a restos alifáticos que contienen uno o más átomos de oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo o silicio, por ejemplo, en lugar de átomos de carbono. Los restos heteroalifáticos pueden ser ramificados, no ramificados, cíclicos o acíclicos, e incluyen heterociclos saturados e insaturados tales como morfolino, pirrolidino, etc. Los restos heteroalifáticos pueden estar sustituidos mediante reemplazo independiente de uno o más de los átomos de hidrógeno en ellos por uno o más restos que incluyen, pero no se limitan a, alifático; heteroalifático; arilo; heteroarilo; arilalquilo; heteroarilalquilo; alcoxi; arilo; heteroalcoxi; heteroarilo; alquilo; arililo; heteroalquilo; heteroarililo; -F; -Cl; -Br; -I; -OH; -NO<sub>2</sub>; -CN; -CF<sub>3</sub>; -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>; -CHCl<sub>2</sub>; -CH<sub>2</sub>OH; -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH; -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>; -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; -C(O)R<sub>x</sub>; -CO<sub>2</sub>(R<sub>x</sub>); -CON(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -OC(O)R<sub>x</sub>; -OCO<sub>2</sub>R<sub>x</sub>; -OCON(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -N(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -S(O)<sub>2</sub>R<sub>x</sub>; -NR<sub>x</sub>(CO)R<sub>x</sub>, en los que cada aparición de R<sub>x</sub> independientemente incluye, pero no se limita a, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, arilalquilo o heteroarilalquilo, en el que cualquiera de los sustituyentes alifáticos, heteroalifáticos, arilalquilo o heteroarilalquilo descritos anteriormente y aquí puede estar sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado, cíclico o acíclico, y en el que cualquiera de los sustituyentes arilo o heteroarilo descritos anteriormente y aquí puede estar sustituido o no sustituido. Los ejemplos adicionales de sustituyentes generalmente aplicables se ilustran en los Ejemplos que se describen aquí.

25 El término "alquilo", como se usa aquí, se refiere a radicales hidrocarbonados saturados de cadena lineal o ramificada derivados de un resto hidrocarbonado que contiene entre uno y veinte átomos de carbono mediante la eliminación de un solo átomo de hidrógeno. El grupo alquilo empleado en la descripción puede contener 1 a 20 átomos de carbono (alquilo de C<sub>1-20</sub>). El grupo alquilo empleado puede contener 1-15 átomos de carbono (alquilo de C<sub>1-15</sub>). El grupo alquilo empleado puede contener 1-10 átomos de carbono (alquilo de C<sub>1-10</sub>). El grupo alquilo empleado puede contener 1-8 átomos de carbono (alquilo de C<sub>1-8</sub>). El grupo alquilo empleado puede contener 1-6 átomos de carbono (alquilo de C<sub>1-6</sub>). El grupo alquilo empleado puede contener 1-5 átomos de carbono (alquilo de C<sub>1-5</sub>). El grupo alquilo empleado puede contener 1-4 átomos de carbono (alquilo de C<sub>1-4</sub>). El grupo alquilo empleado puede contener 1-3 átomos de carbono (alquilo de C<sub>1-3</sub>). El grupo alquilo empleado puede contener 1-2 átomos de carbono (alquilo de C<sub>1-2</sub>). Los ejemplos de radicales alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo, sec-pentilo, isopentilo, terc-butilo, n-pentilo, neopentilo, n-hexilo, sec-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-decilo, n-undecilo, dodecilo y similares, que pueden portar uno o más sustituyentes. Los sustituyentes del grupo alquilo incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los sustituyentes descritos aquí, que dan como resultado la formación de un resto estable.

30 El término "alquilenilo", como se usa aquí, se refiere a un birradical derivado de un grupo alquilo, como se define aquí, mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno. Los grupos alquilenilo pueden ser cíclicos o acíclicos, ramificados o no ramificados, sustituidos o no sustituidos. Los sustituyentes del grupo alquilenilo incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los sustituyentes descritos aquí, que dan como resultado la formación de un resto estable.

35 El término "alqueno", como se usa aquí, se refiere a un grupo monovalente derivado de un resto hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono mediante la eliminación de un solo átomo de hidrógeno. El grupo alqueno empleado en la descripción puede contener 2-20 átomos de carbono (alqueno).

de C<sub>2-20</sub>). El grupo alqueno empleado en la descripción puede contener 2-15 átomos de carbono (alqueno de C<sub>2-15</sub>). El grupo alqueno empleado puede contener 2-10 átomos de carbono (alqueno de C<sub>2-10</sub>). El grupo alqueno puede contener 2-8 átomos de carbono (alqueno de C<sub>2-8</sub>). El grupo alqueno puede contener 2-6 carbonos (alqueno de C<sub>2-6</sub>). El grupo alqueno puede contener 2-5 carbonos (alqueno de C<sub>2-5</sub>). El grupo alqueno puede contener 2-4 carbonos (alqueno de C<sub>2-4</sub>). El grupo alqueno puede contener 2-3 carbonos (alqueno de C<sub>2-3</sub>). El grupo alqueno puede contener 2 carbonos (alqueno de C<sub>2</sub>). Los grupos alqueno incluyen, por ejemplo, etenilo, propenilo, butenilo, 1-metil-2-buten-1-ilo, y similares, que pueden portar uno o más sustituyentes. Los sustituyentes del grupo alqueno incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los sustituyentes descritos aquí, que dan como resultado la formación de un resto estable. El término "alquenoileno", como se usa aquí, se refiere a un birradical derivado de un grupo alqueno, como se define aquí, mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno. Los grupos alquenoileno pueden ser cíclicos o acíclicos, ramificados o no ramificados, sustituidos o no sustituidos. Los sustituyentes del grupo alquenoileno incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los sustituyentes descritos aquí, que dan como resultado la formación de un resto estable.

El término "alquino", como se usa aquí, se refiere a un grupo monovalente derivado de un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono mediante la eliminación de un solo átomo de hidrógeno. El grupo alquino empleado en la descripción puede contener 2-20 átomos de carbono (alquino de C<sub>2-20</sub>). El grupo alquino empleado en la descripción puede contener 2-15 átomos de carbono (alquino de C<sub>2-15</sub>). El grupo alquino empleado puede contener 2-10 átomos de carbono (alquino de C<sub>2-10</sub>). El grupo alquino puede contener 2-8 átomos de carbono (alquino de C<sub>2-8</sub>). El grupo alquino puede contener 2-6 átomos de carbono (alquino de C<sub>2-6</sub>). El grupo alquino puede contener 2-5 átomos de carbono (alquino de C<sub>2-5</sub>). El grupo alquino puede contener 2-4 átomos de carbono (alquino de C<sub>2-4</sub>). El grupo alquino puede contener 2-3 átomos de carbono (alquino de C<sub>2-3</sub>). El grupo alquino puede contener 2 átomos de carbono (alquino de C<sub>2</sub>). Los grupos alquino representativos incluyen, pero no se limitan a, etinilo, 2-propinilo (propargilo), 1-propinilo, y similares, que pueden portar uno o más sustituyentes. Los sustituyentes del grupo alquino incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los sustituyentes descritos aquí, que dan como resultado la formación de un resto estable. El término "alquinoileno", como se usa aquí, se refiere a un birradical derivado de un grupo alquino, como se define aquí, mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno. Los grupos alquinoileno pueden ser cíclicos o acíclicos, ramificados o no ramificados, sustituidos o no sustituidos. Los sustituyentes del grupo alquinoileno incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los sustituyentes descritos aquí, que dan como resultado la formación de un resto estable.

El término "heteroalquilo" se refiere a un grupo alquilo, que incluye además al menos un heteroátomo (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4 heteroátomos) seleccionado de oxígeno, nitrógeno o azufre dentro de (es decir, insertado entre átomos de carbono adyacentes de) y/o colocado en una o más posiciones terminales de la cadena principal. Un grupo heteroalquilo puede referirse a un grupo saturado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono y 1 o más heteroátomos en la cadena principal ("heteroalquilo de C<sub>1-10</sub>"). Un grupo heteroalquilo puede ser un grupo saturado que tiene 1 a 9 átomos de carbono y 1 o más heteroátomos en la cadena principal ("heteroalquilo de C<sub>1-9</sub>"). Un grupo heteroalquilo puede ser un grupo saturado que tiene 1 a 8 átomos de carbono y 1 o más heteroátomos en la cadena principal ("heteroalquilo de C<sub>1-8</sub>"). Un grupo heteroalquilo puede ser un grupo saturado que tiene 1 a 7 átomos de carbono y 1 o más heteroátomos en la cadena principal ("heteroalquilo de C<sub>1-7</sub>"). Un grupo heteroalquilo puede ser un grupo saturado que tiene 1 a 6 átomos de carbono y 1 o más heteroátomos en la cadena principal ("heteroalquilo de C<sub>1-6</sub>"). Un grupo heteroalquilo puede ser un grupo saturado que tiene 1 a 5 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos en la cadena principal ("heteroalquilo de C<sub>1-5</sub>"). Un grupo heteroalquilo puede ser un grupo saturado que tiene de 1-4 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos en la cadena principal ("heteroalquilo de C<sub>1-4</sub>"). Un grupo heteroalquilo puede ser un grupo saturado que tiene 1 a 3 átomos de carbono y 1 heteroátomo en la cadena principal ("heteroalquilo de C<sub>1-3</sub>"). Un grupo heteroalquilo puede ser un grupo saturado que tiene 1 a 2 átomos de carbono y 1 heteroátomo en la cadena principal ("heteroalquilo de C<sub>1-2</sub>"). Un grupo heteroalquilo puede ser un grupo saturado que tiene 1 átomo de carbono y 1 heteroátomo ("heteroalquilo de C<sub>1</sub>"). Un grupo heteroalquilo puede ser un grupo saturado que tiene 2 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos en la cadena principal ("heteroalquilo de C<sub>2-6</sub>"). A menos que se especifique lo contrario, cada aparición de un grupo heteroalquilo está independientemente no sustituida (un "heteroalquilo no sustituido") o sustituida (un "heteroalquilo sustituido") con uno o más sustituyentes. El grupo heteroalquilo puede ser un heteroalquilo de C<sub>1-10</sub> no sustituido. El grupo heteroalquilo puede ser un heteroalquilo de C<sub>1-10</sub> sustituido.

El término "heteroalqueno" se refiere a un grupo alqueno, que incluye además al menos un heteroátomo (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 heteroátomos) seleccionado de oxígeno, nitrógeno o azufre dentro de (es decir, insertado entre átomos de carbono adyacentes de) y/o colocado en una o más posiciones terminales de la cadena principal. Un grupo heteroalqueno puede referirse a un grupo que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o más heteroátomos en la cadena principal ("heteroalqueno de C<sub>2-10</sub>"). Un grupo heteroalqueno puede tener 2 a 9 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o más heteroátomos en la cadena principal ("heteroalqueno de C<sub>2-9</sub>"). Un grupo heteroalqueno puede tener 2 a 8 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o más heteroátomos en la cadena principal ("heteroalqueno de C<sub>2-8</sub>"). Un grupo heteroalqueno puede tener 2 a 7 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o más heteroátomos en la cadena principal ("heteroalqueno de C<sub>2-7</sub>"). Un grupo heteroalqueno puede tener 2 a 6 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o más heteroátomos en la cadena principal ("heteroalqueno de C<sub>2-6</sub>"). Un grupo heteroalqueno puede tener 2 a 5 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o 2 heteroátomos en la cadena principal ("heteroalqueno de C<sub>2-5</sub>"). Un grupo heteroalqueno puede tener 2 a 4 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o 2 heteroátomos en la cadena principal.

(“heteroalquenilo de C<sub>2-4</sub>”). Un grupo heteroalquenilo puede tener 2 a 3 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 heteroátomo en la cadena principal (“heteroalquenilo de C<sub>2-3</sub>”). Un grupo heteroalquenilo puede tener 2 a 6 átomos de carbono, al menos un doble enlace, y 1 o 2 heteroátomos en la cadena principal (“heteroalquenilo de C<sub>2-6</sub>”). A menos que se especifique lo contrario, cada aparición de un grupo heteroalquenilo está independientemente no sustituida (un “heteroalquenilo no sustituido”) o sustituida (un “heteroalquenilo sustituido”) con uno o más sustituyentes. El grupo heteroalquenilo puede ser un grupo heteroalquenilo de C<sub>2-10</sub> no sustituido. El grupo heteroalquenilo puede ser un heteroalquenilo de C<sub>2-10</sub> sustituido.

El término “heteroalquinilo” se refiere a un grupo alquinilo, que incluye además al menos un heteroátomo (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 heteroátomos) seleccionado de oxígeno, nitrógeno o azufre dentro de (es decir, insertado entre átomos de carbono adyacentes de) y/o colocado en una o más posiciones terminales de la cadena principal. Un grupo heteroalquinilo puede referirse a un grupo que tiene de 2 a 10 átomos de carbono, al menos un enlace triple y 1 o más heteroátomos en la cadena principal (“heteroalquinilo de C<sub>2-10</sub>”). Un grupo heteroalquinilo puede tener 2 a 9 átomos de carbono, al menos un enlace triple y 1 o más heteroátomos en la cadena principal (“heteroalquinilo de C<sub>2-9</sub>”). Un grupo heteroalquinilo puede tener 2 a 8 átomos de carbono, al menos un enlace triple y 1 o más heteroátomos en la cadena principal (“heteroalquinilo de C<sub>2-8</sub>”). Un grupo heteroalquinilo puede tener 2 a 7 átomos de carbono, al menos un enlace triple y 1 o más heteroátomos en la cadena principal (“heteroalquinilo de C<sub>2-7</sub>”). Un grupo heteroalquinilo puede tener 2 a 6 átomos de carbono, al menos un triple enlace y 1 o más heteroátomos en la cadena principal (“heteroalquinilo de C<sub>2-6</sub>”). Un grupo heteroalquinilo puede tener 2 a 5 átomos de carbono, al menos un enlace triple y 1 o 2 heteroátomos en la cadena principal (“heteroalquinilo de C<sub>2-5</sub>”). Un grupo heteroalquinilo puede tener 2 a 4 átomos de carbono, al menos un enlace triple y 1 o 2 heteroátomos en la cadena principal (“heteroalquinilo de C<sub>2-4</sub>”). Un grupo heteroalquinilo puede tener 2 a 3 átomos de carbono, al menos un enlace triple y 1 heteroátomo en la cadena principal (“heteroalquinilo de C<sub>2-3</sub>”). Un grupo heteroalquinilo puede tener 2 a 6 átomos de carbono, al menos un enlace triple y 1 o 2 heteroátomos en la cadena principal (“heteroalquinilo de C<sub>2-6</sub>”). A menos que se especifique lo contrario, cada aparición de un grupo heteroalquinilo está independientemente no sustituida (un “heteroalquinilo no sustituido”) o sustituida (un “heteroalquinilo sustituido”) con uno o más sustituyentes. El grupo heteroalquinilo puede ser un grupo heteroalquinilo de C<sub>2-10</sub> no sustituido. El grupo heteroalquinilo puede ser un heteroalquinilo de C<sub>2-10</sub> sustituido.

El término “carbociclilo” o “carbocíclico” se refiere a un radical de un grupo hidrocarbonado cíclico no aromático que tiene de 3 a 14 átomos de carbono anulares (“carbociclilo de C<sub>3-14</sub>”) y cero heteroátomos en el sistema anular no aromático. Un grupo carbociclilo puede tener 3 a 10 átomos de carbono anulares (“carbociclilo de C<sub>3-10</sub>”). Un grupo carbociclilo puede tener 3 a 8 átomos de carbono anulares (“carbociclilo de C<sub>3-8</sub>”). Un grupo carbociclilo puede tener 3 a 7 átomos de carbono anulares (“carbociclilo de C<sub>3-7</sub>”). Un grupo carbociclilo puede tener 3 a 6 átomos de carbono anulares (“carbociclilo de C<sub>3-6</sub>”). Un grupo carbociclilo puede tener 4 a 6 átomos de carbono anulares (“carbociclilo de C<sub>4-6</sub>”). Un grupo carbociclilo puede tener 5 a 6 átomos de carbono anulares (“carbociclilo de C<sub>5-6</sub>”). Un grupo carbociclilo puede tener 5-10 átomos de carbono anulares (“carbociclilo de C<sub>5-10</sub>”). Grupos carbociclilo de C<sub>3-6</sub> ejemplares incluyen, sin limitación, ciclopropilo (C<sub>3</sub>), ciclopropenilo (C<sub>3</sub>), ciclobutilo (C<sub>4</sub>), ciclobutenilo (C<sub>4</sub>), ciclopentilo (C<sub>5</sub>), ciclopentenilo (C<sub>5</sub>), ciclohexilo (C<sub>6</sub>), ciclohexenilo (C<sub>6</sub>), ciclohexadienilo (C<sub>6</sub>), y similares. Grupos carbociclilo de C<sub>3-8</sub> ejemplares incluyen, sin limitación, los grupos carbociclilo de C<sub>3-6</sub> anteriormente mencionados, así como cicloheptilo (C<sub>7</sub>), cicloheptenilo (C<sub>7</sub>), cicloheptadienilo (C<sub>7</sub>), cicloheptatrienilo (C<sub>7</sub>), ciclooctilo (C<sub>8</sub>), ciclooctenilo (C<sub>8</sub>), biciclo[2.2.1]heptanilo (C<sub>7</sub>), biciclo[2.2.2]octanilo (C<sub>8</sub>), y similares. Ejemplar C<sub>3-10</sub> Los grupos carbociclilo incluyen, sin limitación, los grupos carbociclilo de C<sub>3-8</sub> anteriormente mencionados, así como ciclononilo (C<sub>9</sub>), ciclononenilo (C<sub>9</sub>), ciclodecilo (C<sub>10</sub>), ciclodecenilo (C<sub>10</sub>), octahidro-1*H*-indenilo (C<sub>9</sub>), decahidronaftalenilo (C<sub>10</sub>), espiro[4.5]decanilo (C<sub>10</sub>), y similares. Como ilustran los ejemplos anteriores, el grupo carbociclilo puede ser monocíclico (“carbociclilo monocíclico”) o policíclico (por ejemplo, que contiene un sistema anular condensado, con puente o espiro, tal como un sistema bicíclico (“carbociclilo bicíclico”) o un sistema tricíclico (“carbociclilo tricíclico”), y puede estar saturado o puede contener uno o más enlaces dobles o triples carbono-carbono. “Carbociclilo” también incluye sistemas anulares en los que el anillo carbociclilo, como se define anteriormente, está condensado con uno o más grupos arilo o heteroarilo en los que el punto de unión está en el anillo carbociclilo, y en tales casos, el número de carbonos continúa designando el número de carbonos en el sistema anular carbocíclico. A menos que se especifique lo contrario, cada aparición de un grupo carbociclilo está independientemente no sustituida (un “carbociclilo no sustituido”) o sustituida (un “carbociclilo sustituido”) con uno o más sustituyentes. El grupo carbociclilo puede ser un carbociclilo de C<sub>3-14</sub> no sustituido. El grupo carbociclilo puede ser un carbociclilo de C<sub>3-14</sub> sustituido.

“Carbociclilo” puede ser un grupo carbociclilo saturado monocíclico que tiene de 3 a 14 átomos de carbono anulares (“cicloalquilo de C<sub>3-14</sub>”). Un grupo cicloalquilo puede tener de 3 a 10 átomos de carbono anulares (“cicloalquilo de C<sub>3-10</sub>”). Un grupo cicloalquilo puede tener 3 a 8 átomos de carbono anulares (“cicloalquilo de C<sub>3-8</sub>”). Un grupo cicloalquilo puede tener 3 a 6 átomos de carbono anulares (“cicloalquilo de C<sub>3-6</sub>”). Un grupo cicloalquilo puede tener 4 a 6 átomos de carbono anulares (“cicloalquilo de C<sub>4-6</sub>”). Un grupo cicloalquilo puede tener 5 a 6 átomos de carbono anulares (“cicloalquilo de C<sub>5-6</sub>”). Un grupo cicloalquilo puede tener 5 a 10 átomos de carbono anulares (“cicloalquilo de C<sub>5-10</sub>”). Ejemplos de grupos cicloalquilo de C<sub>5-6</sub> incluyen ciclopentilo (C<sub>5</sub>) y ciclohexilo (C<sub>6</sub>). Ejemplos de grupos cicloalquilo de C<sub>3-6</sub> incluyen los grupos cicloalquilo C<sub>5-6</sub> anteriormente mencionados, así como ciclopropilo (C<sub>3</sub>) y ciclobutilo (C<sub>4</sub>). Ejemplos de grupos cicloalquilo de C<sub>3-8</sub> incluyen los grupos cicloalquilo de C<sub>3-6</sub> anteriormente mencionados, así como cicloheptilo (C<sub>7</sub>) y ciclooctilo (C<sub>8</sub>). A menos que se especifique lo contrario, cada aparición de un grupo cicloalquilo está independientemente no sustituida (un “cicloalquilo no sustituido”) o sustituida (un “cicloalquilo sustituido”) con uno

o más sustituyentes. El grupo cicloalquilo puede ser un cicloalquilo de C<sub>3-14</sub> no sustituido. El grupo cicloalquilo puede ser un cicloalquilo de C<sub>3-14</sub> sustituido.

El término “heterociclilo” o “heterocíclico” se refiere a un radical de un sistema anular no aromático de 3 a 14 miembros que tiene átomos de carbono anulares y 1 a 4 heteroátomos anulares, en el que cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre (“heterociclilo de 3-14 miembros”). En los grupos heterociclilo que contienen uno o más átomos de nitrógeno, el punto de unión puede ser un átomo de carbono o nitrógeno, según lo permita la valencia. Un grupo heterociclilo puede ser monocíclico (“heterociclilo monocíclico”) o policíclico (por ejemplo, un sistema anular condensado, con puente o espiro, tal como un sistema bicíclico (“heterociclilo bicíclico”) o un sistema tricíclico (“heterociclilo tricíclico”)), y puede estar saturado o puede contener uno o más enlaces dobles o triples carbono-carbono. Los sistemas anulares policíclicos de heterociclilo pueden incluir uno o más heteroátomos en uno o ambos anillos. “Heterociclilo” también incluye sistemas anulares en los que el anillo heterociclilo, como se define anteriormente, está condensado con uno o más grupos carbociclilo en los que el punto de unión está en el anillo carbociclilo o heterociclilo, o sistemas anulares en los que el anillo heterociclilo, como se define anteriormente, está condensado con uno o más grupos arilo o heteroarilo, en los que el punto de unión está en el anillo heterociclilo, y en tales casos, el número de miembros anulares continúa designando el número de miembros anulares en el sistema anular heterociclilo. A menos que se especifique lo contrario, cada aparición de heterociclilo está independientemente no sustituida (un “heterociclilo no sustituido”) o sustituida (un “heterociclilo sustituido”) con uno o más sustituyentes. El grupo heterociclilo puede ser un heterociclilo de 3-14 miembros no sustituido. El grupo heterociclilo puede ser un heterociclilo de 3-14 miembros sustituido.

Un grupo heterociclilo puede ser un sistema anular no aromático de 5-10 miembros que tiene átomos de carbono anulares y 1-4 heteroátomos anulares, en el que cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre (“heterociclilo de 5-10 miembros”). Un grupo heterociclilo puede ser un sistema anular no aromático de 5-8 miembros que tiene átomos de carbono anulares y 1-4 heteroátomos anulares, en el que cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre (“heterociclilo de 5-8 miembros”). Un grupo heterociclilo puede ser un sistema anular no aromático de 5-6 miembros que tiene átomos de carbono anulares y 1-4 heteroátomos anulares, en el que cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre (“heterociclilo de 5-6 miembros”). El heterociclilo de 5-6 miembros puede tener 1-3 heteroátomos anulares seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre. El heterociclilo de 5-6 miembros puede tener 1-2 heteroátomos anulares seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre. El heterociclilo de 5-6 miembros puede tener 1 heteroátomo anular seleccionado de nitrógeno, oxígeno y azufre.

Los ejemplos de grupos heterociclilo de 3 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, azirdinilo, oxiranilo y tiiranilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 4 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, azetidino, oxetanilo y tietanilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 5 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, tetrahidrofuranilo, dihidrofuranilo, tetrahidrotiofenilo, dihidrotiofenilo, pirrolidinilo, dihidropirrolilo y pirrolidinilo-2,5-diona. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 5 miembros que contienen 2 heteroátomos incluyen, sin limitación, dioxolanilo, oxatolanilo y ditiolanilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 5 miembros que contienen 3 heteroátomos incluyen, sin limitación, triazolinilo, oxadiazolinilo y tiadiazolinilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 6 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, piperidinilo, tetrahidropiranilo, dihidropiridinilo y tianilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 6 miembros que contienen 2 heteroátomos incluyen, sin limitación, piperazinilo, morfolinilo, ditiolanilo y dioxanilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 6 miembros que contienen 2 heteroátomos incluyen, sin limitación, triazinanilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 7 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, azepanilo, oxepanilo y tiepanilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo de 8 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, azocanilo, oxecanilo y tiocanilo. Los ejemplos de grupos heterociclilo bicíclicos incluyen, sin limitación, isoindolinilo, dihidrobenzofuranilo, dihidrobenzotienilo, tetrahidrobenzofuranilo, tetrahidroindolilo, tetrahidroquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, decahidroisoquinolinilo, octahidrocromenilo, octahidroisocromenilo, decahidronaftiridinilo, decahidro-1,8-naftiridinilo, octahidropirrololo[3,2-b]pirrolo, indolinilo, ftalimidilo, naftalimidilo, cromanilo, cromenilo, 1H-benzo[e][1,4]diazepinilo, 1,4,5,7-tetrahidropirano[3,4-b]pirrolilo, 5,6-dihidro-4H-furo[3,2-b]pirrolilo, 6,7-dihidro-5H-furo[3,2-b]piranilo, 5,7-dihidro-4H-tieno[2,3-c]piranilo, 2,3-dihidro-1H-pirrololo[2,3-b]piridinilo, 2,3-dihidrofuro[2,3-b]piridinilo, 4,5,6,7-tetrahidro-1H-pirrololo[2,3-b]piridinilo, 4,5,6,7-tetrahidrofuro[3,2-c]piridinilo, 4,5,6,7-tetrahidrotieno[3,2-b]piridinilo, 1,2,3,4-tetrahidro-1,6-naftiridinilo, y similares.

El término “arilo” se refiere a un radical de un sistema anular aromático monocíclico o policíclico (por ejemplo, bicíclico o tricíclico) 4n+2 (por ejemplo, que tiene 6, 10 o 14 electrones  $\pi$  compartidos en una matriz cíclica) que tiene 6-14 átomos de carbono anulares y cero heteroátomos provistos en el sistema anular aromático (“arilo de C<sub>6-14</sub>”). Un grupo arilo puede tener 6 átomos de carbono anulares (“arilo de C<sub>6</sub>”; por ejemplo, fenilo). Un grupo arilo puede tener 10 átomos de carbono anulares (“arilo de C<sub>10</sub>”; por ejemplo naftilo tal como 1-naftilo y 2-naftilo). Un grupo arilo puede tener 14 átomos de carbono anulares (“arilo de C<sub>14</sub>”; por ejemplo antracilo). “Arilo” también incluye sistemas anulares en los que el anillo arilo, como se define anteriormente, está condensado con uno o más grupos carbociclilo o heterociclilo en los que el radical o punto de unión está en el anillo arilo, y en tales casos, el número de átomos de carbono continúa designando el número de átomos de carbono en el sistema anular de arilo. A menos que se especifique lo contrario, cada aparición de un grupo arilo está independientemente no sustituida (un “arilo no

sustituido”) o sustituida (un “arilo sustituido”) con uno o más sustituyentes. El grupo arilo puede ser un arilo de  $C_{6-14}$  no sustituido. El grupo arilo puede ser un arilo de  $C_{6-14}$  sustituido.

El término “heteroarilo” se refiere a un radical de un sistema anular aromático monocíclico o policíclico de 5-14 miembros (por ejemplo, bicíclico, tricíclico)  $4n+2$  (por ejemplo, que tienen 6, 10 o 14 electrones  $\pi$  compartidos en una matriz cíclica) que tiene átomos de carbono anulares y 1-4 heteroátomos anulares provistos en el sistema anular aromático, en el que cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre (“heteroarilo de 5-14 miembros”). En los grupos heteroarilo que contienen uno o más átomos de nitrógeno, el punto de unión puede ser un átomo de carbono o nitrógeno, según lo permita la valencia. Los sistemas anulares policíclicos de heteroarilo pueden incluir uno o más heteroátomos en uno o ambos anillos. “Heteroarilo” incluye sistemas anulares en los que el anillo de heteroarilo, como se define anteriormente, está condensado con uno o más grupos carbocíclico o heterocíclico en los que el punto de unión está en el anillo de heteroarilo, y en tales casos, el número de miembros anulares continúa designando el número de miembros anulares en el sistema anular de heteroarilo. “Heteroarilo” también incluye sistemas anulares en los que el anillo heteroarilo, como se define anteriormente, está condensado con uno o más grupos arilo en los que el punto de unión está en el anillo arilo o heteroarilo, y en tales casos, el número de miembros anulares designa el número de miembros anulares en el sistema anular policíclico condensado (arilo/heteroarilo). Grupos heteroarilo policíclicos en los que un anillo no contiene un heteroátomo (por ejemplo, indolilo, quinolinilo, carbazolilo y similares) el punto de unión puede estar en cualquier anillo, es decir, ya sea el anillo que porta un heteroátomo (por ejemplo, 2-indolilo) o el anillo que no contiene un heteroátomo (por ejemplo, 5-indolilo).

Un grupo heteroarilo puede ser un sistema anular aromático de 5-10 miembros que tiene átomos de carbono anulares y 1-4 heteroátomos anulares provistos en el sistema anular aromático, en el que cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre (“heteroarilo de 5-10 miembros”). Un grupo heteroarilo puede ser un sistema anular aromático de 5-8 miembros que tiene átomos de carbono anulares y 1-4 heteroátomos anulares provistos en el sistema anular aromático, en el que cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre (“heteroarilo de 5-8 miembros”). Un grupo heteroarilo puede ser un sistema anular aromático de 5-6 miembros que tiene átomos de carbono anulares y 1-4 heteroátomos anulares provistos en el sistema anular aromático, en el que cada heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre (“heteroarilo de 5-6 miembros”). El heteroarilo de 5-6 miembros puede tener 1-3 heteroátomos anulares seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre. El heteroarilo de 5-6 miembros puede tener 1-2 heteroátomos anulares seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre. El heteroarilo de 5-6 miembros puede tener 1 heteroátomo anular seleccionado de nitrógeno, oxígeno y azufre. A menos que se especifique lo contrario, cada aparición de un grupo heteroarilo está independientemente no sustituida (un “heteroarilo no sustituido”) o sustituida (un “heteroarilo sustituido”) con uno o más sustituyentes. El grupo heteroarilo puede ser un heteroarilo de 5-14 miembros no sustituido. El grupo heteroarilo puede ser un heteroarilo de 5-14 miembros sustituido.

Los ejemplos de grupos heteroarilo de 5 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, pirrolilo, furanilo y tiofenilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo de 5 miembros que contienen 2 heteroátomos incluyen, sin limitación, imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo e isotiazolilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo de 5 miembros que contienen 3 heteroátomos incluyen, sin limitación, triazolilo, oxadiazolilo y tiadiazolilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo de 5 miembros que contienen 4 heteroátomos incluyen, sin limitación, tetrazolilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo de 6 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, piridinilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo de 6 miembros que contienen 2 heteroátomos incluyen, sin limitación, piridazinilo, pirimidinilo y pirazinilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo de 6 miembros que contienen 3 o 4 heteroátomos incluyen, sin limitación, triazinilo y tetrazinilo, respectivamente. Los ejemplos de grupos heteroarilo de 7 miembros que contienen 1 heteroátomo incluyen, sin limitación, azepinilo, oxepinilo y tiepinilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo 5,6-bicíclico incluyen, sin limitación, indolilo, isoindolilo, indazolilo, benzotriazolilo, benzotiofenilo, isobenzotiofenilo, benzofuranilo, benzoisofuranilo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, bencisoxazolilo, benzoxadiazolilo, benzotiazolilo, bencisotiazolilo, benzotiadiazolilo, indolizínilo y purínilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo 6,6-bicíclico incluyen, sin limitación, naftiridinilo, pteridinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, cinolinilo, quinoxalinilo, ftalazinilo y quinazolinilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo tricíclico incluyen, sin limitación, fenantridinilo, dibenzofuranilo, carbazolilo, acridínilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo y fenazinilo.

El término “insaturado” o “parcialmente insaturado” se refiere a un resto que incluye al menos un doble o triple enlace.

Añadir el sufijo “-eno” a un grupo indica que el grupo es un resto divalente, por ejemplo alquileo es el resto divalente de alquilo, alquilenilo es el resto divalente de alquénilo, alquinileno es el resto divalente de alquínilo, heteroalquileo es el resto divalente de heteroalquilo, heteroalquilenilo es el resto divalente de heteroalquénilo, heteroalquinileno es el resto divalente de heteroalquínilo, carbociclileno es el resto divalente de carbocíclico, heterociclileno es el resto divalente de heterocíclico, arileno es el resto divalente de arilo, y heteroarileno es el resto divalente de heteroarilo.

Un grupo está opcionalmente sustituido a menos que se indique expresamente lo contrario. Los grupos alquilo, alquénilo, alquínilo, heteroalquilo, heteroalquénilo, heteroalquínilo, carbocíclico, heterocíclico, arilo y heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos. “Opcionalmente sustituido” se refiere a un grupo que puede estar sustituido o no sustituido (por ejemplo, grupo alquilo “sustituido” o “no sustituido”, alquénilo “sustituido” o “no sustituido”, alquínilo “sustituido” o “no sustituido”, heteroalquilo “sustituido” o “no sustituido”, heteroalquénilo “sustituido” o “no sustituido”, heteroalquínilo “sustituido” o “no sustituido”, carbocíclico “sustituido” o “no sustituido”, heterocíclico “sustituido” o “no sustituido”,

sustituido", arilo "sustituido" o "no sustituido", o heteroarilo "sustituido" o "no sustituido"). En general, el término "sustituido" significa que al menos un hidrógeno presente en un grupo se reemplaza por un sustituyente permisible, por ejemplo un sustituyente que tras la sustitución da como resultado un compuesto estable, por ejemplo un compuesto que no experimenta una transformación espontánea tal como por reordenamiento, ciclización, eliminación u otra reacción. A menos que se indique lo contrario, un grupo "sustituido" tiene un sustituyente en una o más posiciones sustituibles del grupo, y cuando se sustituye más de una posición en cualquier estructura dada, el sustituyente es el mismo o diferente en cada posición. Se contempla que el término "sustituido" incluya la sustitución con todos los sustituyentes permisibles de los compuestos orgánicos, e incluye cualquiera de los sustituyentes descritos aquí que dé como resultado la formación de un compuesto estable. La presente descripción contempla todas y cada una de dichas combinaciones para llegar a un compuesto estable. Para los fines de esta descripción, los heteroátomos tal como el nitrógeno pueden tener sustituyentes de hidrógeno y/o cualquier sustituyente adecuado como se describe aquí que satisfaga las valencias de los heteroátomos y dé como resultado la formación de un resto estable. No se pretende que la descripción esté limitada de ninguna manera por los sustituyentes ejemplares descritos aquí.

El término "halo" o "halógeno" se refiere al flúor (fluoro, -F), cloro (cloro, -Cl), bromo (bromo, -Br) o yodo (yodo, -I).

El término "amino" se refiere al grupo -NH<sub>2</sub>. El término "amino sustituido", por extensión, se refiere a un amino monosustituido, un amino disustituido o un amino trisustituido. El "amino sustituido" puede ser un grupo amino monosustituido o amino disustituido.

La expresión "amino monosustituido" se refiere a un grupo amino en el que el átomo de nitrógeno unido directamente a la molécula original está sustituido con un hidrógeno y un grupo distinto del hidrógeno, e incluye grupos seleccionados de -NH(R<sup>bb</sup>), -NHC(=O)R<sup>aa</sup>, -NHCO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -NHC(=O)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -NHC(=NR<sup>bb</sup>)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -NHSO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -NHP(=O)(OR<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, y -NHP(=O)(NR<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, en los que R<sup>aa</sup>, R<sup>bb</sup> y R<sup>cc</sup> son como se definen aquí, y en los que R<sup>bb</sup> del grupo -NH(R<sup>bb</sup>) no es hidrógeno.

La expresión "amino disustituido" se refiere a un grupo amino en el que el átomo de nitrógeno unido directamente a la molécula original está sustituido con dos grupos distintos del hidrógeno, e incluye grupos seleccionados de -N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>bb</sup>C(=O)R<sup>aa</sup>, -NR<sup>bb</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -NR<sup>bb</sup>C(=O)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>bb</sup>C(=NR<sup>bb</sup>)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -NR<sup>bb</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -NR<sup>bb</sup>P(=O)(OR<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, y -NR<sup>bb</sup>P(=O)(NR<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, en los que R<sup>aa</sup>, R<sup>bb</sup> y R<sup>cc</sup> son como se definen aquí, con la condición de que el átomo de nitrógeno unido directamente a la molécula original no esté sustituido con hidrógeno.

La expresión "amino trisustituido" se refiere a un grupo amino en el que el átomo de nitrógeno unido directamente a la molécula original está sustituido con tres grupos, e incluye grupos seleccionados de -N(R<sup>bb</sup>)<sub>3</sub> y -N(R<sup>bb</sup>)<sub>3</sub>X<sup>-</sup>, en los que R<sup>bb</sup> y X<sup>-</sup> son como se definen aquí.

El sustituyente presente en el átomo de nitrógeno puede ser un grupo protector de nitrógeno (también denominado aquí "grupo protector de amino"). Los grupos protectores de nitrógeno incluyen, pero no se limitan a, grupos -OH, -OR<sup>aa</sup>, -N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -C(=O)R<sup>aa</sup>, -C(=O)N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -C(=NR<sup>cc</sup>)R<sup>aa</sup>, -C(=NR<sup>cc</sup>)OR<sup>aa</sup>, -C(=NR<sup>cc</sup>)N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>R<sup>cc</sup>, -SO<sub>2</sub>OR<sup>cc</sup>, -SOR<sup>aa</sup>, -C(=S)N(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -C(=O)SR<sup>cc</sup>, -C(=S)SR<sup>cc</sup>, alquilo de C<sub>1-10</sub> (por ejemplo, aralquilo, heteroaralquilo), alquenilo de C<sub>2-10</sub>, alquinilo de C<sub>2-10</sub>, hetero-alquilo de C<sub>1-10</sub>, hetero-alquenilo de C<sub>2-10</sub>, hetero-alquinilo de C<sub>2-10</sub>, carbociclilo de C<sub>3-10</sub>, heterociclilo de 3-14 miembros, arilo de C<sub>6-14</sub> y heteroarilo de 5-14 miembros, en los que cada alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, carbociclilo, heterociclilo, aralquilo, arilo y heteroarilo está sustituido independientemente con 0, 1, 2, 3, 4 o 5 grupos R<sup>dd</sup>, y en los que R<sup>aa</sup>, R<sup>bb</sup>, R<sup>cc</sup> y R<sup>dd</sup> son como se definen aquí. Los grupos protectores de nitrógeno son bien conocidos en la técnica, e incluyen los descritos en detalle Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3ª edición, John Wiley & Sons, 1999.

Por ejemplo, los grupos protectores de nitrógeno tales como grupos amida (por ejemplo, -C(=O)R<sup>aa</sup>) incluyen, pero no se limitan a, formamida, acetamida, cloroacetamida, tricloroacetamida, trifluoroacetamida, fenilacetamida, 3-fenilpropanamida, picolinamida, 3-piridilcarboxamida, derivado de *N*-benzoilfenilalanilo, benzamida, *p*-fenilbenzamida, o-nitrofenilacetamida, o-nitrofenoxiacetamida, acetoacetamida, (N'-ditiobenciloxiacilamino)acetamida, 3-(*p*-hidroxifenil)propanamida, 3-(*o*-nitrofenil)propanamida, 2-metil-2-(*o*-nitrofenoxi)propanamida, 2-metil-2-(*o*-fenilazofenoxi)propanamida, 4-clorobutanamida, 3-metil-3-nitrobutanamida, o-nitrocinnamida, derivado de *N*-acetilmetionina, o-nitrobenzamida y o-(benzoiloximetil)benzamida.

Grupos protectores de nitrógeno tales como grupos carbamato (por ejemplo, -C(=O)O<sup>aa</sup>) incluyen, pero no se limitan a, carbamato de metilo, carbamato de etilo, carbamato de 9-fluorenilmetilo (Fmoc), carbamato de 9-(2-sulfo)fluorenilmetilo, carbamato de 9-(2,7-dibromo)fluorenilmetilo, carbamato de 2,7-di-*t*-butil-[9-(10,10-dioxo-10,10,10-tetrahidrotioxantil)]metilo (DBD-Tmoc), carbamato de 4-metoxifenacilo (Phenoc), carbamato de 2,2,2-tricloroetilo (Troc), 2-trimetilsililetilo (Teoc), carbamato de 2-feniletilo (hZ), carbamato de 1-(1-adamantil)-1-metiletilo (Adpoc), carbamato de 1,1-dimetil-2-haloetilo, carbamato de 1,1-dimetil-2,2-dibromoetilo (DB-*t*-BOC), carbamato de 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetilo (TCBOC), carbamato de 1-metil-1-(4-bifenilil)etilo (Bpoc), carbamato de 1-(3,5-di-*t*-butilfenil)-1-metiletilo (*t*-Bumeoc), carbamato de 2-(2'- y 4'-piridil)etilo (Pyoc), carbamato de 2-(*N,N*-díciclohexilcarboxamido)etilo, carbamato de *t*-butilo (BOC o Boc), carbamato de 1-adamantilo (Adoc), carbamato de vinilo (Voc), carbamato de alilo (Alloc), carbamato de 1-isopropilalilo (Ipaoc), carbamato de cinamilo (Coc), carbamato de 4-nitrocinnamilo (Noc), carbamato de 8-quinolilo, carbamato de *N*-hidroxipiperidinilo, carbamato de alquilditio,

carbamato de bencilo (Cbz), carbamato de *p*-metoxibencilo (Moz), carbamato de *p*-nitobencilo, carbamato de *p*-bromobencilo, carbamato de *p*-clorobencilo, carbamato de 2,4-diclorobencilo, carbamato de 4-metilsulfinilbencilo (MsZ), carbamato de 9-antrilmetilo, carbamato de difenilmetilo, carbamato de 2-metiltioetilo, carbamato de 2-metilsulfoniletilo, carbamato de 2-(*p*-toluenosulfonil)etilo, carbamato de [2-(1,3-ditianil)]metilo (Dmoc), carbamato de 4-metiltiofenilo (Mtpc), carbamato de 2,4-dimetiltiofenilo (Bmpc), carbamato de 2-fosfonioetilo (Peoc), carbamato de 2-trifenilfosfonioisopropilo (Ppoc), carbamato de 1,1-dimetil-2-cianoetilo, carbamato de *m*-cloro-*p*-aciloxibencilo, carbamato de *p*-(dihidroxiboril)bencilo, carbamato de 5-bencisoxazolilmetilo, carbamato de 2-(trifluorometil)-6-cromonilmetilo (Tcroc), carbamato de *m*-nitrofenilo, carbamato de 3,5-dimetoxibencilo, carbamato de *o*-nitrobencilo, carbamato de 3,4-dimetoxi-6-nitrobencilo, carbamato de fenil(*o*-nitrofenil)metilo, carbamato de *t*-amilo, tiocarbamato de *S*-bencilo, carbamato de *p*-cianobencilo, carbamato de ciclobutilo, carbamato de ciclohexilo, carbamato de ciclopentilo, carbamato de ciclopropilmetilo, carbamato de *p*-deciloxibencilo, carbamato de 2,2-dimetoxiacilvinilo, carbamato de *o*-(*N,N*-dimetilcarboxamido)bencilo, carbamato de 1,1-dimetil-3-(*N,N*-dimetilcarboxamido)propilo, carbamato de 1,1-dimetilpropinilo, carbamato de di(2-piridil)metilo, carbamato de 2-furanilmetilo, carbamato de 2-yodoetilo, carbamato de isoborinilo, carbamato de isobutilo, carbamato de isonicotinilo, carbamato de *p*-(*p*'-metoxifenilazo)bencilo, carbamato de 1-metilciclobutilo, carbamato de 1-metilciclohexilo, carbamato de 1-metil-1-ciclopropilmetilo, carbamato de 1-metil-1-(3,5-dimetoxifenil)etilo, carbamato de 1-metil-1-(*p*-fenilazofenil)etilo, carbamato de 1-metil-1-feniletilo, carbamato de 1-metil-1-(4-piridil)etilo, carbamato de fenilo, carbamato de *p*-(fenilazo)bencilo, carbamato de 2,4,6-tri-*t*-butilfenilo, carbamato de 4-(trimetilamonio)bencilo, y carbamato de 2,4,6-trimetilbencilo.

Grupos protectores de nitrógeno tales como grupos sulfonamida (por ejemplo, -S(=O)<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>) incluyen, pero no se limitan a, *p*-toluenosulfonamida (Ts), bencenosulfonamida, 2,3,6-trimetil-4-metoxibencenosulfonamida (Mtr), 2,4,6-trimetoxibencenosulfonamida (Mtb), 2,6-dimetil-4-metoxibencenosulfonamida (Pme), 2,3,5,6-tetrametil-4-metoxibencenosulfonamida (Mte), 4-metoxibencenosulfonamida (Mbs), 2,4,6-trimetilbencenosulfonamida (Mts), 2,6-dimetoxi-4-metilbencenosulfonamida (iMds), 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonamida (Pmc), metanosulfonamida (Ms), β-trimetilsililetanosulfonamida (SES), 9-antracenosulfonamida, 4-(4',8'-dimetoxinaftilmetil)bencenosulfonamida (DNMBS), bencilsulfonamida, trifluorometilsulfonamida, y fenacilsulfonamida.

Otros grupos protectores de nitrógeno incluyen, pero no se limitan a, derivado de fenotiazinil-(10)-acilo, derivado de *N*'-*p*-toluenosulfonilaminoacilo, derivado de *N*'-fenilaminotioacilo, derivado de *N*-benzoilfenilalanilo, derivado de *N*-acetilmetionina, 4,5-difenil-3-oxazolin-2-ona, *N*-ftalimida, *N*-ditiassuccinimida (Dts), *N*-2,3-difenilmaleimida, *N*-2,5-dimetilpirrol, aducto de *N*-1,1,4,4-tetrametildisililazaciclopentano (STABASE), 1,3-dimetil-1,3,5-triazaciclohexan-2-ona 5-sustituida, 1,3-dibencil-1,3,5-triazaciclohexan-2-ona 5-sustituida, 3,5-dinitro-4-piridona 1-sustituida, *N*-metilamina, *N*-alilamina, *N*-[2-(trimetilsilil)etoxi]metilamina (SEM), *N*-3-acetoxipropilamina, *N*-(1-isopropil-4-nitro-2-oxo-3-pirrolin-3-il)amina, sales de amonio cuaternario, *N*-bencilamina, *N*-di(4-metoxifenil)metilamina, *N*-5-dibenzosuberilamina, *N*-trifenilmetilamina (Tr), *N*-[(4-metoxifenil)difenilmetil]amina (MMTr), *N*-9-fenilfluorenilamina (PhF), *N*-2,7-dicloro-9-fluorenilmetilamina, *N*-ferrocenilmetilamina (Fcm), *N*'-óxido de *N*-2-picolilamino, *N*-1,1-dimetiltiometilamina, *N*-bencilidenamina, *N*-*p*-metoxibencilidenamina, *N*-difenilmetilamina, *N*-[(2-piridil)mesitil]metilamina, *N*-(*N*',*N*'-dimetilaminometil)amina, *N*,*N*'-isopropilidendiamina, *N*-*p*-nitrobencilidenamina, *N*-salicilidenamina, *N*-5-clorosalicilidenamina, *N*-(5-cloro-2-hidroxifenil)fenilmetilamina, *N*-ciclohexilidenamina, *N*-(5,5-dimetil-3-oxo-1-ciclohexenil)amina, derivado de *N*-borano, derivado de ácido *N*-difenilborínico, *N*-[fenil(pentaacilcromo- o volframio)acil]amina, quelato de *N*-cobre, quelato de *N*-zinc, *N*-nitroamina, *N*-nitrosoamina, *N*-óxido de amina, difenilfosfinamida (Dpp), dimetiltiofosfinamida (Mpt), difeniltiofosfinamida (Ppt), fosforamidatos de dialquilo, fosforamidato de dibencilo, fosforamidato de difenilo, bencenosulfenamida, *o*-nitrobencenosulfenamida (Nps), 2,4-dinitrobencenosulfenamida, pentaclorobencenosulfenamida, 2-nitro-4-metoxibencenosulfenamida, trifenilmetilsulfenamida, y 3-nitropiridinsulfenamida (Npys).

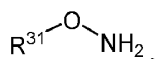
El sustituyente presente en un átomo de oxígeno puede ser un grupo protector de oxígeno (también denominado aquí "grupo protector de hidroxilo"). Los grupos protectores de oxígeno incluyen, pero no se limitan a, -R<sup>aa</sup>, -N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -C(=O)SR<sup>aa</sup>, -C(=O)OR<sup>aa</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -C(=O)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -C(=NR<sup>bb</sup>)R<sup>aa</sup>, -C(=NR<sup>bb</sup>)OR<sup>aa</sup>, -C(=NR<sup>bb</sup>)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -S(=O)R<sup>aa</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -Si(R<sup>aa</sup>)<sub>3</sub>, -P(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -P(R<sup>cc</sup>)<sub>3</sub>, -P(=O)<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -P(=O)(R<sup>aa</sup>)<sub>2</sub>, -P(=O)(OR<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -P(=O)<sub>2</sub>N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, y -P(=O)(NR<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, en los que R<sup>aa</sup>, R<sup>bb</sup> y R<sup>cc</sup> son como se definen aquí. Los grupos protectores de oxígeno son bien conocidos en la técnica, e incluyen los descritos en detalle en Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene y P. G. M. Wuts, 3ª edición, John Wiley & Sons, 1999.

Los ejemplos de grupos protectores de oxígeno incluyen, pero no se limitan, metilo, metoxilmetilo (MOM), metiltiometilo (MTM), *t*-butiltiometilo, (fenildimetilsilil)metoximetilo (SMOM), benciloximetilo (BOM), *p*-metoxibenciloximetilo (PMBM), (4-metoxifenoxi)metilo (*p*-AOM), guayacolmetilo (GUM), *t*-butoximetilo, 4-penteniloximetilo (POM), siloximetilo, 2-metoxietoximetilo (MEM), 2,2,2-tricloroetoximetilo, bis(2-cloroetoxi)metilo, 2-(trimetilsilil)etoximetilo (SEMOR), tetrahidropirano (THP), 3-bromotetrahidropirano, tetrahidrotiopirano, 1-metoxiciclohexilo, 4-metoxitetrahidropirano (MTHP), 4-metoxitetrahidrotiopirano, *S,S*-dióxido de 4-metoxitetrahidrotiopirano, 1-[(2-cloro-4-metil)fenil]-4-metoxipiperidin-4-ilo (CTMP), 1,4-dioxan-2-ilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofuranilo, 2,3,3a,4,5,6,7,7a-octahidro-7,8,8-trimetil-4,7-metanobenzofuran-2-ilo, 1-etoxietilo, 1-(2-cloroetoxi)etilo, 1-metil-1-metoxietilo, 1-metil-1-benciloxietilo, 1-metil-1-benciloxi-2-fluoroetilo, 2,2,2-tricloroetilo, 2-trimetilsililetilo, 2-(fenilselenil)etilo, *t*-butilo, alilo, *p*-clorofenilo, *p*-metoxifenilo, 2,4-dinitrofenilo, bencilo (Bn), *p*-metoxibencilo, 3,4-dimetoxibencilo, *o*-nitrobencilo, *p*-nitrobencilo, *p*-halobencilo, 2,6-diclorobencilo, *p*-cianobencilo, *p*-fenilbencilo, 2-picolilo, 4-picolilo, *N*-óxido de 3-metil-

2-picolilo, difenilmetilo, p,p'-dinitrobenzidrido, 5-dibenzosuberilo, trifenilmetilo,  $\alpha$ -naftildifenilmetilo, p-metoxifenildifenilmetilo, di(p-metoxifenil)fenilmetilo, tri(p-metoxifenil)metilo, 4-(4'-bromofenaciloxifenil)difenilmetilo, 4,4',4"-tris(4,5-dicloroftalimidofenil)metilo, 4,4',4"-tris(levulinoiloxifenil)metilo, 4,4',4"-tris(benzoiloxifenil)metilo, 3-(imidazol-1-il)bis(4',4"-dimetoxifenil)metilo, 1,1-bis(4-metoxifenil)-1'-pirenilmetilo, 9-antrilo, 9-(9-fenil)xantenilo, 9-(9-fenil-10-oxo)antrilo, 1,3-benzoditiolan-2-ilo, S,S-dióxido de bencisotiazolilo, trimetilsililo (TMS), trietilsililo (TES), triisopropilsililo (TIPS), dimetilisopropilsililo (IPDMS), dietilisopropilsililo (DEIPS), dimetilhexilsililo, t-butildimetilsililo (TBDMS), t-butildifenilsililo (TBDPS), tribencilsililo, tri-p-xililsililo, trifenilsililo, difenilmetilsililo (DPMS), t-butilmetoxifenilsililo (TBMPS), formato, benzoilformato, acetato, cloroacetato, dicloroacetato, tricloroacetato, trifluoroacetato, metoxiacetato, trifenilmetoxiacetato, fenoxiacetato, p-clorofenoxiacetato, 3-fenilpropionato, 4-oxopentanoato (levulinato), 4,4-(etilenoditio)pentanoato (levulinoilditioacetal), pivaloato, adamantato, crotonato, 4-metoxicrotonato, benzoato, p-fenilbenzoato, 2,4,6-trimetilbenzoato (mesitoato), metilcarbonato, 9-fluorenilmetilcarbonato (Fmoc), etilcarbonato, 2,2,2-tricloroetilcarbonato (Troc), 2-(trimetilsilil)etilcarbonato (TMSEC), 2-(fenilsulfonil)etilcarbonato (Psec), 2-(trifenilfosfonio)etilcarbonato (Peoc), isobutilcarbonato, vinilcarbonato, alilcarbonato, t-butilcarbonato (BOC or Boc), p-nitrofenilcarbonato, bencilcarbonato, p-metoxibencilcarbonato, 3,4-dimetoxibencilcarbonato, o-nitrobencilcarbonato, p-nitrobencilcarbonato, S-benciltiocarbonato, 4-etoxi-1-naftilcarbonato, metilditiocarbonato, 2-yodobenzoato, 4-azidobutirato, 4-nitro-4-metilpentanoato, o-(dibromometil)benzoato, 2-formilbencenosulfonato, 2-(metiltiometoxi)etilo, 4-(metiltiometoxi)butirato, 2-(metiltiometoximetil)benzoato, 2,6-dicloro-4-metilfenoxiacetato, 2,6-dicloro-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenoxiacetato, 2,4-bis(1,1-dimetilpropil)fenoxiacetato, clorodifenilacetato, isobutirato, monosuccinato, (E)-2-metil-2-butenato, o-(metoxiacil)benzoato,  $\alpha$ -naftoato, nitrato, alquilo N,N,N',N'-tetrametilfosforodiamidato, N-fenilcarbamato de alquilo, borato, dimetilfosfotioilo, 2,4-dinitrofenilsulfonato de alquilo, sulfato, metanosulfonato (mesilato), bencilsulfonato, y tosilato (Ts).

El sustituyente presente en un átomo de azufre puede ser un grupo protector de azufre (también denominado "grupo protector de tiol"). Los grupos protectores de azufre incluyen, pero no se limitan a, -R<sup>aa</sup>, -N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -C(=O)SR<sup>aa</sup>, -C(=O)R<sup>aa</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -C(=O)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -C(=NR<sup>bb</sup>)R<sup>aa</sup>, -C(=NR<sup>bb</sup>)OR<sup>aa</sup>, -C(=NR<sup>bb</sup>)N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, -S(=O)R<sup>aa</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -Si(R<sup>aa</sup>)<sub>3</sub>, -P(R<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -P(R<sup>cc</sup>)<sub>3</sub>, -P(=O)<sub>2</sub>R<sup>aa</sup>, -P(=O)(R<sup>aa</sup>)<sub>2</sub>, -P(=O)(OR<sup>cc</sup>)<sub>2</sub>, -P(=O)<sub>2</sub>N(R<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, y -P(=O)(NR<sup>bb</sup>)<sub>2</sub>, en los que R<sup>aa</sup>, R<sup>bb</sup> y R<sup>cc</sup> son como se definen aquí. Los grupos protectores de azufre son bien conocidos en la técnica, e incluyen los descritos en detalle en Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene y P. G. M. Wuts, 3ª edición, John Wiley & Sons, 1999.

Los términos "aminooxi" o "grupo aminooxi" se usan indistintamente aquí, y se refieren a grupos funcionales que tienen la fórmula general:



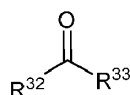
en la que R<sup>31</sup> es alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclilo opcionalmente sustituido. R<sup>31</sup> puede ser un aminoácido, en el que el punto de unión para el oxígeno está en la cadena lateral del aminoácido. El aminoácido puede estar dentro de un polipéptido.

Los términos "tautómeros" o "tautomérico" se refiere a dos o más compuestos interconvertibles resultantes de al menos una migración formal de un átomo de hidrógeno y al menos un cambio de valencia (por ejemplo, un enlace sencillo a un enlace doble, un enlace triple a un enlace sencillo, o viceversa). La relación exacta de los tautómeros depende de varios factores, incluidos la temperatura, el disolvente y el pH. Las tautomerizaciones (es decir, la reacción que proporciona un par tautomérico) pueden ser catalizadas por ácidos o bases. Las tautomerizaciones ejemplares incluyen tautomerizaciones ceto a enol, amida a imida, lactama a lactima, enamina a imina y enamina a (una enamina diferente).

También debe entenderse que los compuestos que tienen la misma fórmula molecular pero difieren en la naturaleza o secuencia de enlace de sus átomos o en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "isómeros". Los isómeros que difieren en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan "estereoisómeros".

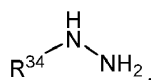
Los estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí se denominan "diastereómeros", y los que son imágenes especulares no superponibles entre sí se denominan "enantiómeros". Cuando un compuesto tiene un centro asimétrico, por ejemplo está enlazado a cuatro grupos diferentes, es posible un par de enantiómeros. Un enantiómero se puede caracterizar por la configuración absoluta de su centro asimétrico y se describe mediante las reglas de secuenciación R y S de Cahn y Prelog, o por la forma en que la molécula gira el plano de la luz polarizada y se designa como dextrorrotatoria o levorrotatoria (es decir, como (+) o (-)-isómeros respectivamente). Un compuesto quiral puede existir como enantiómero individual o como una mezcla de los mismos. Una mezcla que contiene proporciones iguales de los enantiómeros se denomina "mezcla racémica".

Los términos "carbonilo" o "grupo carbonilo" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a grupos funcionales compuestos por un átomo de carbono con doble enlace a cualquier átomo de oxígeno. Los carbonilos tienen la fórmula general:



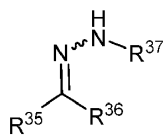
en la que cada uno de  $R^{32}$  y  $R^{33}$  representa independientemente hidroxilo, amino opcionalmente sustituido, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclilo opcionalmente sustituido. Los ejemplos de carbonilos incluyen, pero no se limitan, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, enonas, haluros de acilo, anhídridos de ácido, e imidas. Un compuesto que contiene carbonilo puede referirse a un compuesto que tiene un grupo aldehído, o un compuesto capaz de formar un grupo aldehído a través de la isomerización. Por ejemplo, ciertos azúcares (por ejemplo, azúcares reductores) tal como glucosa forman aldehídos a través de la isomerización. Un azúcar se clasifica como azúcar reductor si tiene una forma de cadena abierta con un grupo aldehído o un grupo hemiacetal libre. Los monosacáridos que contienen un grupo aldehído se conocen como aldosas, y los que tienen un grupo cetona se conocen como cetosas. El aldehído se puede oxidar mediante una reacción redox en la que se reduce otro compuesto. Así, un azúcar reductor es aquel que es capaz de reducir ciertas sustancias químicas. Los azúcares con grupos cetona en su forma de cadena abierta son capaces de isomerizarse a través de una serie de cambios tautoméricos para producir un grupo aldehído en disolución. Por lo tanto, los azúcares que portan cetona, tal como fructosa, se consideran azúcares reductores, pero es el isómero que contiene un grupo aldehído el que es reductor, ya que las cetonas no se pueden oxidar sin la descomposición del azúcar. Este tipo de isomerización es catalizada por la base presente en disoluciones que prueban la presencia de aldehídos.

El término "hidrazida", como se usa aquí, se refiere a grupos funcionales que tienen la fórmula general:

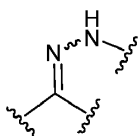


en la que  $R^{34}$  es alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclilo opcionalmente sustituido.  $R^{34}$  puede ser un aminoácido, en el que el punto de unión para el oxígeno está en la cadena lateral del aminoácido. El aminoácido puede estar dentro de un polipéptido.

El término "hidrazona", como se usa aquí, se refiere a un compuesto que tiene la fórmula general:



en la que cada uno de  $R^{35}$ ,  $R^{36}$  y  $R^{37}$  es independientemente alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclilo opcionalmente sustituido. La expresión "enlace de hidrazona", como se usa aquí, se refiere a la fórmula:



Las hidrazonas pueden prepararse, por ejemplo, a partir de la unión de un compuesto que comprende un grupo hidrazida y un compuesto que comprende un carbonilo.

El término "acilo", como se usa aquí, es un subconjunto de un grupo alquilo sustituido, y se refiere a un grupo que tiene la fórmula general  $-C(=O)R^A$ ,  $-C(=O)OR^A$ ,  $-C(=O)-O-C(=O)R^A$ ,  $-C(=O)SR^A$ , o  $-C(=O)N(R^A)_2$ , en la que cada aparición de  $R^A$  es independientemente hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclilo opcionalmente sustituido. Los grupos acilo ejemplares incluyen aldehídos ( $-CHO$ ), ácidos carboxílicos ( $-CO_2H$ ), cetonas, haluros de acilo, ésteres, amidas, iminas, carbonatos, carbamatos, y ureas. Los sustituyentes acilo incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los sustituyentes descritos aquí, que dan como resultado la formación de un resto estable.

El término "azida" o "azido", como se usa aquí, se refiere a un grupo de fórmula  $(-N_3)$ .

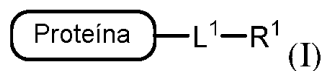
Proteínas radiomarcadas

Los aspectos de la descripción proporcionan anticuerpos, o fragmentos de los mismos (por ejemplo, anticuerpos de dominio único) que comprenden un radiomarcador y/o un polímero hidrófilo. Debe apreciarse que cualquiera de los enlaces proporcionados aquí puede usarse para unir proteínas (por ejemplo, anticuerpos) a un radiomarcador y/o un

polímero hidrófilo. También debe apreciarse que los agentes, tales como los restos quelantes y los radionúclidos proporcionados a continuación, pueden sustituirse por otros agentes, tales como cualquiera de los restos quelantes y los radionúclidos proporcionados aquí.

Otro aspecto de la presente descripción proporciona proteínas radiomarcadas. Las proteínas radiomarcadas se pueden preparar a partir de proteínas modificadas de Fórmula (I).

Aquí se proporciona una proteína modificada de Fórmula (I):



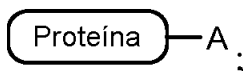
en la que

$\text{L}^1$  es un enlazador que comprende al menos cuatro aminoácidos formado por conjugación enzimática entre dos secuencias de reconocimiento de enzimas; y

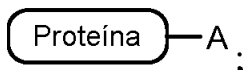
$\text{R}^1$  comprende un grupo reactivo capaz de sufrir una reacción de química de clic.

Como se define en general aquí,  $\text{L}^1$  es un enlazador formado por conjugación enzimática entre dos secuencias de reconocimiento de enzimas.  $\text{L}^1$  puede comprender al menos cuatro aminoácidos.  $\text{L}^1$  puede comprender al menos cinco aminoácidos.  $\text{L}^1$  puede comprender al menos seis aminoácidos.  $\text{L}^1$  puede comprender al menos siete aminoácidos.  $\text{L}^1$  puede ser un enlazador formado por transpeptidación mediada por sortasa de dos secuencias de reconocimiento de sortasa.  $\text{L}^1$  puede ser -LPXTGGGK-, -LPXTGGG-, -NPXTGGGK-, NPXTGGG-, -LPXTAAA-, -NPXTAAA-, -LPXTGGGGG- o -LPGAG-, en los que cada aparición de X es independientemente un aminoácido. X puede ser E, Q, K.

La proteína modificada puede formarse por conjugación enzimática de



y un compuesto de Fórmula (a):  $\text{B-R}^1$  (a), en las que cada uno de A y B es independientemente una secuencia de reconocimiento de enzima. La proteína modificada puede formarse por transpeptidación mediada por sortasa de



y el compuesto de fórmula (a):  $\text{B-R}^1$  (a), en las que A comprende una secuencia de reconocimiento de sortasa C-terminal, y B comprende una secuencia de reconocimiento de sortasa extremo N-terminal; o A comprende una secuencia de reconocimiento de sortasa extremo N-terminal, y B comprende una secuencia de reconocimiento de sortasa C-terminal.

A puede comprender LPXTX o NPXTX, y B puede comprender una secuencia de oligoglicina o de oligoalanina; en la que cada aparición de X es independientemente un aminoácido. B puede comprender LPXTX o NPXTX, y A puede comprender una secuencia de oligoglicina o de oligoalanina; en la que cada aparición de X es independientemente un aminoácido. A puede ser LPETG, LPETA, NPQTN o NPKTG y B puede ser GGG o AAA. A puede comprender una secuencia de oligoglicina u oligoalanina, y B puede comprender LPXTX o NPXTX, en la que cada aparición de X es independientemente un aminoácido. B puede ser LPETG, LPETA, NPQTN o NPKTG y A puede ser GGG o AAA.

Como se usa aquí, la secuencia de reconocimiento de enzimas es una secuencia de aminoácidos reconocida por una enzima transamidasa. La secuencia de reconocimiento de transamidasa puede ser una secuencia de reconocimiento de sortasa o un motivo de reconocimiento de sortasa. La sortasa puede ser sortasa A (SrtA). La sortasa puede ser sortasa B (SrtB).

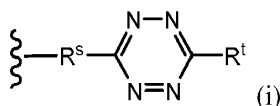
Como se define en general aquí,  $\text{R}^1$  es un grupo reactivo capaz de sufrir una reacción de química de clic.

La química de clic es un enfoque químico introducido por Sharpless en 2001, y se describe a medida para generar sustancias de forma rápida y fiable mediante la unión de pequeñas unidades. Véanse, por ejemplo, Kolb, Finn and Sharpless *Angewandte Chemie International Edition* (2001) 40: 2004-2021; Evans, *Australian Journal of Chemistry* (2007) 60: 384-395. Ejemplos de reacciones de acoplamiento (algunas de las cuales pueden clasificarse como "química de clic") incluyen, pero no se limitan a, formación de ésteres, tioésteres, amidas (por ejemplo, tal como acoplamiento de péptidos) a partir de ácidos activados o haluros de acilo; reacciones de desplazamiento nucleófilo (por ejemplo, tal como el desplazamiento nucleófilo de un haluro o la apertura del anillo de sistemas anulares tensionados); cicloadición de Huisgen de azida-alquino; adición de tiol-ino; formación de iminas; adiciones de Michael (por ejemplo, adición de maleimida); reacción de Diels-Alder y reacción de Diels-Alder de demanda inversa de electrones; y cicloadiciones [4+1] (por ejemplo, entre isonitrilos (isocianuros) y tetrazinas). La reacción de química de

clic puede ser una reacción de Diels-Alder. Debe entenderse que la reacción de química de clic puede ir seguida de una o más transformaciones químicas adicionales. La reacción de química de clic puede ser una reacción de Diels-Alder, seguida de una retrorreacción de Diels-Alder.

5 R<sup>1</sup> puede ser un grupo reactivo capaz de sufrir una cicloadición [3+2]. R<sup>1</sup> puede comprender un dipolarófilo. R<sup>1</sup> puede comprender un grupo alquinilo. R<sup>1</sup> puede comprender un dipolo 1,3. R<sup>1</sup> puede comprender un azido. R<sup>1</sup> puede ser un grupo reactivo capaz de sufrir una cicloadición de Diels-Alder. R<sup>1</sup> puede comprender un dieno conjugado. R<sup>1</sup> puede comprender una tetrazina o un cuadrícicloro. R<sup>1</sup> puede comprender una tetrazina. R<sup>1</sup> puede comprender una tetrazina no sustituida. R<sup>1</sup> puede comprender una tetrazina sustituida.

R<sup>1</sup> puede ser de Fórmula (i):



en la que

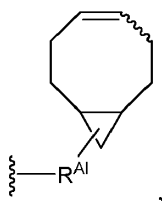
R<sup>t</sup> es hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclilo opcionalmente sustituido; y

15 R<sup>s</sup> es un enlace, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arileno opcionalmente sustituido, heteroarileno opcionalmente sustituido, o heterociclileno opcionalmente sustituido.

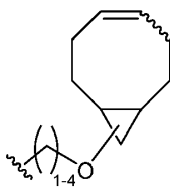
Como se define en general aquí, R<sup>t</sup> es hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclilo opcionalmente sustituido. R<sup>t</sup> puede ser hidrógeno. R<sup>t</sup> puede ser alifático opcionalmente sustituido. R<sup>t</sup> puede ser alquilo de C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido. R<sup>t</sup> puede ser alquilo de C<sub>1-6</sub> no sustituido. R<sup>t</sup> puede ser metilo o etilo. R<sup>t</sup> puede ser alquilo de C<sub>1-6</sub> sustituido. R<sup>t</sup> puede ser arilo opcionalmente sustituido. R<sup>t</sup> puede ser fenilo opcionalmente sustituido. R<sup>t</sup> puede ser heteroarilo opcionalmente sustituido. R<sup>t</sup> puede ser piridina opcionalmente sustituida.

25 Como se define en general aquí, R<sup>s</sup> es un enlace, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arileno opcionalmente sustituido, heteroarileno opcionalmente sustituido o heterociclileno opcionalmente sustituido. R<sup>s</sup> puede ser un enlace. R<sup>s</sup> puede ser alifático opcionalmente sustituido. R<sup>s</sup> puede ser alquilo de C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido. R<sup>s</sup> puede ser alquilo de C<sub>1-6</sub> no sustituido. R<sup>s</sup> puede ser metilo o etilo. R<sup>s</sup> puede ser alquilo de C<sub>1-6</sub> sustituido. R<sup>s</sup> puede ser heteroalifático opcionalmente sustituido. R<sup>s</sup> puede ser arileno opcionalmente sustituido. R<sup>s</sup> puede ser fenilo opcionalmente sustituido. R<sup>s</sup> puede ser heteroarileno opcionalmente sustituido. R<sup>s</sup> puede ser piridina opcionalmente sustituida.

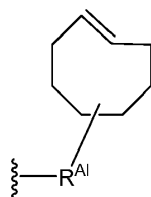
30 R<sup>1</sup> puede comprender un dienófilo. R<sup>1</sup> puede comprender un alqueno opcionalmente sustituido. R<sup>1</sup> puede comprender un cicloocteno. R<sup>1</sup> puede comprender un cicloocteno sustituido de la fórmula:



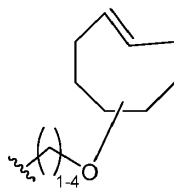
en la que R<sup>Al</sup> es un enlace, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arileno opcionalmente sustituido, heteroarileno opcionalmente sustituido o heterociclileno opcionalmente sustituido. R<sup>1</sup> comprende un cicloocteno sustituido de la fórmula:



35 R<sup>1</sup> puede comprender un *trans*-cicloocteno. R<sup>1</sup> puede comprender un *trans*-cicloocteno sustituido de la fórmula

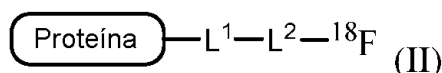


en la que  $R^{Al}$  es como se define aquí.  $R^1$  puede comprender un *trans*-cicloocteno sustituido de la fórmula



en la que  $R^{Al}$  es como se define aquí.  $R^1$  puede comprender un *trans*-cicloocteno no sustituido.

- 5 Otro aspecto de la descripción proporciona una proteína radiactiva de Fórmula (II)



en la que

$L^1$  es un enlazador que comprende al menos cuatro aminoácidos formado por conjugación enzimática entre dos secuencias de reconocimiento de enzimas; y

- 10  $L^2$  es alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arileno opcionalmente sustituido, heteroarileno opcionalmente sustituido o heterociclileno opcionalmente sustituido.

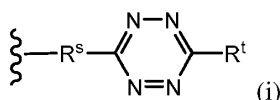
El enlazador  $L^2$  puede estar formado por una reacción de química de clic. El enlazador  $L^2$  puede estar formado por una cicloadición [3+2]. El enlazador  $L^2$  puede estar formado por una cicloadición de Diels-Alder. El enlazador  $L^2$  puede estar formado por una cicloadición de Diels-Alder, seguida de una o más transformaciones químicas. El enlazador  $L^2$  puede estar formado por una cicloadición de Diels-Alder, seguida de una retroreacción de Diels-Alder.

- 15 Como se define en general aquí,  $L^2$  es alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arileno opcionalmente sustituido, heteroarileno opcionalmente sustituido o heterociclileno opcionalmente sustituido.  $L^2$  puede ser alifático opcionalmente sustituido.  $L^2$  puede ser heteroalifático opcionalmente sustituido.  $L^2$  puede ser arileno opcionalmente sustituido.  $L^2$  puede ser cicloalquileo opcionalmente sustituido.  $L^2$  puede ser heteroarileno opcionalmente sustituido.

La proteína radiactiva de Fórmula (II) puede formarse mediante una reacción de química de clic de la proteína modificada de Fórmula (I) y un compuesto de Fórmula (b):  $^{18}F-R^2$  (b), en la que  $R^2$  es un grupo reactivo capaz de sufrir la reacción de química de clic.

- 25 Como se define en general aquí,  $R^2$  es un grupo reactivo capaz de sufrir una reacción de química de clic.  $R^2$  puede ser un grupo insaturado reactivo capaz de sufrir una cicloadición [3+2].  $R^2$  puede comprender un dipolarófilo.  $R^2$  puede comprender un grupo alquínico.  $R^2$  puede comprender un dipolo 1,3.  $R^2$  puede comprender un azido.  $R^2$  puede ser un grupo reactivo capaz de sufrir una cicloadición de Diels-Alder.  $R^2$  puede comprender un dieno conjugado.  $R^2$  puede comprender una tetrazina o un cuadrícicloro.  $R^2$  puede comprender una tetrazina.  $R^2$  puede comprender una tetrazina no sustituida.  $R^2$  puede comprender una tetrazina sustituida.

- 30  $R^2$  puede ser de Fórmula (i):



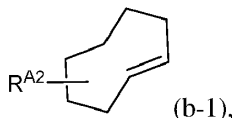
en la que

$R^t$  es hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclilo opcionalmente sustituido; y

R<sup>s</sup> es un enlace, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arileno opcionalmente sustituido, heteroarileno opcionalmente sustituido o heterociclileno opcionalmente sustituido.

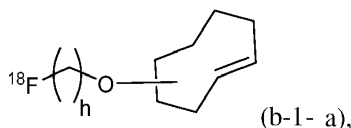
R<sup>2</sup> puede comprender un dienófilo. R<sup>2</sup> puede comprender un alqueno opcionalmente sustituido. R<sup>2</sup> puede comprender un cicloocteno. R<sup>2</sup> puede comprender un *trans*-cicloocteno. R<sup>2</sup> puede comprender un *trans*-cicloocteno sustituido. R<sup>2</sup> puede comprender un *trans*-cicloocteno no sustituido.

Un compuesto de Fórmula (b): <sup>18</sup>F-R<sup>2</sup> (b), puede ser de Fórmula (b-1):



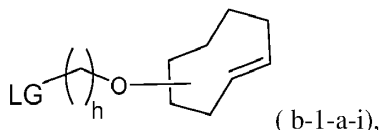
en la que R<sup>A2</sup> es alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclilo opcionalmente sustituido; y R<sup>A2</sup> comprende <sup>18</sup>F. R<sup>A2</sup> puede ser alifático opcionalmente sustituido. R<sup>A2</sup> puede ser heteroalifático opcionalmente sustituido. R<sup>A2</sup> puede ser -O-alquileo de C<sub>1-6</sub>, en el que el alquileo de C<sub>1-6</sub> <sup>18</sup>F.

Un compuesto de Fórmula (b) puede ser de Fórmula (b-1-a):



en la que h es un número entero de 1 a 5, inclusive.

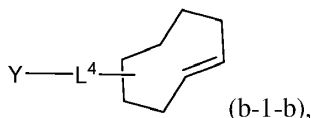
Los compuestos de Fórmula (b-1-a) se pueden preparar a partir de un compuesto de Fórmula (b-1-a-i):



con un nucleófilo adecuado que comprende <sup>18</sup>F, en la que h es como se define aquí, LG es un grupo saliente. Los compuestos de Fórmula (b-1) se pueden preparar según el Esquema S6 o el Esquema S6-a.

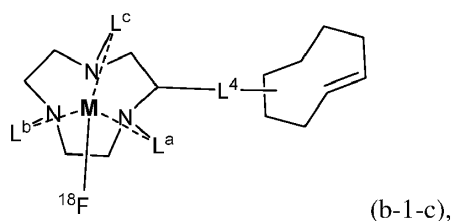
La expresión "grupo saliente" tiene su significado habitual en la técnica de la química orgánica sintética, y se refiere a un átomo o un grupo capaz de ser desplazado por un nucleófilo. Los ejemplos de grupos salientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, halógeno (tal como F, Cl, Br o I (yodo)), alcóxicarbonilo, ariloxycarbonilo, alcanosulfonilo, arenosulfonilo, alquilcarbonilo (por ejemplo, acetoxi), arilcarbonilo, arilo, metoxi, *N,O*-dimetilhidroxilamino, pivalato, y haloformatos. En algunos casos, el grupo saliente es un éster de ácido sulfónico, tal como toluenosulfonato (tosilato, -OTs), metanosulfonato (mesilato, -OMs), *p*-bromobenzenosulfonilo (brosilato, -OBs), o trifluorometanosulfonato (triflato, -OTf). En algunos casos, el grupo saliente es un brosilato, tal como *p*-bromobenzenosulfonilo. En algunos casos, el grupo saliente es un nosilato, tal como 2-nitrobenzenosulfonilo. El grupo saliente puede ser un grupo que contiene sulfonato. El grupo saliente puede ser un grupo tosilato. El grupo saliente también puede ser un óxido de fosfina (por ejemplo, formado durante una reacción de Mitsunobu), o un grupo saliente interno, tal como un epóxido o un sulfato cíclico. Otros ejemplos no limitativos de grupos salientes son agua, amoníaco, alcoholes, restos de éter, restos de tioéter, haluros de zinc, restos de magnesio, sales de diazonio, y restos de cobre. LG puede ser -OTs.

Un compuesto de Fórmula (b) puede ser de Fórmula (b-1-b):



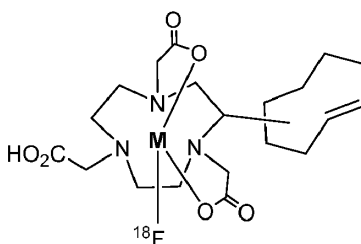
en la que L<sup>4</sup> e Y son como se definen aquí.

Un compuesto de Fórmula (b) puede ser de Fórmula (b-1-c):

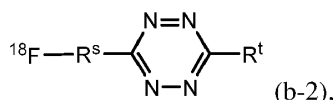


en la que  $L^4$ ,  $M$ ,  $L^a$ ,  $L^b$ , y  $L^c$  son como se definen aquí, y --- indica un enlace de coordinación o ausente, según lo permita la valencia. ---- puede ser un enlace de coordinación sencillo. --- puede estar ausente.

Un compuesto de Fórmula (b) puede ser de la Fórmula:

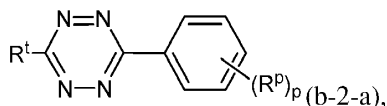


Un compuesto de Fórmula (b):  $^{18}\text{F}-\text{R}^2$  (b), puede ser de Fórmula (b-2):



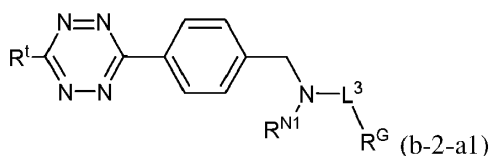
en la que  $\text{R}^s$  y  $\text{R}^t$  son como se definen aquí.

Un compuesto de Fórmula (b) puede ser de Fórmula (b-2-a):



en la que  $\text{R}^t$ ,  $\text{R}^p$ , y  $p$  son como se definen aquí.

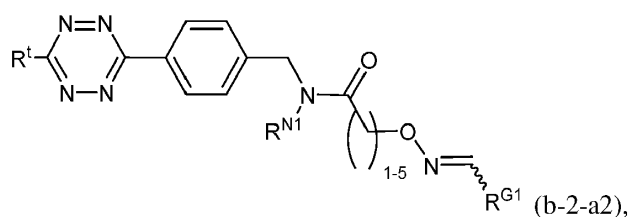
Un compuesto de Fórmula (b) puede ser de Fórmula (b-2-a1):



en la que  $\text{R}^t$ ,  $\text{R}^{\text{N1}}$ ,  $\text{L}^3$ ,  $\text{R}^{\text{q1}}$ , y  $\text{q1}$  son como se definen aquí; y  $\text{R}^G$  es un grupo hidrato de carbono opcionalmente sustituido; siempre que  $\text{R}^G$  comprenda  $^{18}\text{F}$ .

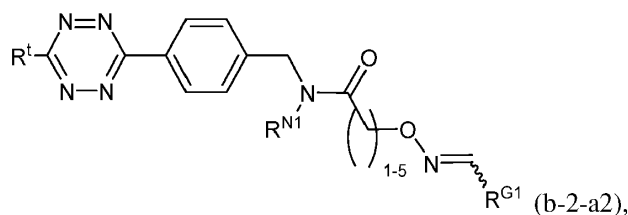
Un "grupo hidrato de carbono" o un "hidrato de carbono" se refiere a un monosacárido o un polisacárido (por ejemplo, un disacárido u oligosacárido). Los monosacáridos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, azúcares naturales, tales como alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa, ribosa, arabinosa, xilosa, y lixosa. Los disacáridos son dos monosacáridos unidos. Los disacáridos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, sacarosa, maltosa, celobiosa, y lactosa. Normalmente, un oligosacárido incluye entre tres y diez unidades de monosacárido (por ejemplo, rafinosa, estaquiosa). El grupo hidrato de carbono puede ser un azúcar natural o un azúcar modificado. Los azúcares modificados ejemplares incluyen, pero no se limitan a, azúcares en los que el grupo hidroxilo se reemplaza por un grupo amino y/o un grupo alquilo (por ejemplo, tal como desosamina), 2'-desoxirribosa, en la que se elimina un grupo hidroxilo, 2'-fluororribosa, en la que un grupo hidroxilo se reemplaza por un flúor, o N-acetilglucosamina, o una forma de glucosa que contiene nitrógeno (por ejemplo, 2'-fluororribosa, desoxirribosa, y hexosa), y similares. Diversos hidratos de carbono se describen más adelante y aquí. Los hidratos de carbono pueden existir en muchas formas diferentes, por ejemplo confórmeros, formas cíclicas, formas acíclicas, estereoisómeros, tautómeros, anómeros, e isómeros.  $\text{R}^G$  puede ser una glucosa opcionalmente sustituida.

Un compuesto de Fórmula (b) puede ser de Fórmula (b-2-a2):

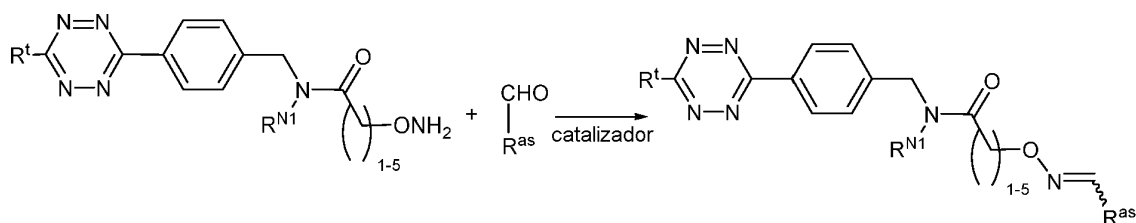


en la que  $R^t$ ,  $R^{N1}$  son como se definen aquí; y  $R^{G1}$  es un grupo hidrato de carbono opcionalmente sustituido o un fragmento del mismo; siempre que  $R^{G1}$  comprenda  $^{18}\text{F}$ .

Los compuestos de oxima de Fórmula (b-2-a2)



se pueden preparar a partir de tetrazina-aminooxi opcionalmente sustituida y un aldehído opcionalmente sustituido radiomarcado de la fórmula  $R^{as}\text{-CHO}$ , en la que  $R^{as}$  es alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterocicilo opcionalmente sustituido (Esquema S1).  $R^{as}$  puede ser un grupo hidrato de carbono opcionalmente sustituido o un fragmento del mismo.  $R^{as}$  puede ser una glucosa opcionalmente sustituida o un fragmento de la misma. La reacción se puede llevar a cabo en presencia de un catalizador. El catalizador puede ser m-fenilendiamina, p-fenilendiamina, o p-anisidina. El catalizador puede ser m-fenilendiamina. La relación molar de la tetrazina-aminooxi opcionalmente sustituida al catalizador puede ser de alrededor de 10:1 a 1:10. La relación molar de la tetrazina-aminooxi opcionalmente sustituida al catalizador puede ser de alrededor de 1:1 a 1:8. La relación molar de la tetrazina-aminooxi opcionalmente sustituida al catalizador puede ser de alrededor de 1:1 a 1:6. La relación molar de la tetrazina-aminooxi opcionalmente sustituida al catalizador puede ser de alrededor de 1:2 a 1:4. La relación molar de la tetrazina-aminooxi opcionalmente sustituida al catalizador puede ser de alrededor de 1:4.



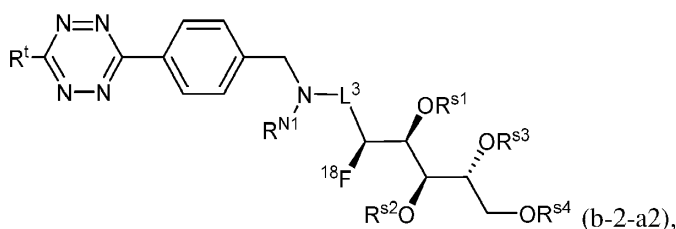
Esquema S1.

$R^{as}$  puede ser un grupo hidrato de carbono opcionalmente sustituido o un fragmento del mismo, siempre que  $R^{as}$  comprenda  $^{18}\text{F}$ .  $R^{as}$  puede ser una glucosa opcionalmente sustituida o un fragmento de la misma.  $R^{as}$  puede ser  $^{18}\text{F}$ -FDG o un fragmento de la misma.

Como se proporciona en el Esquema S1, el producto de oxima resultante se puede purificar fácilmente de la mezcla de reacción hasta el cambio de hidrofilia.

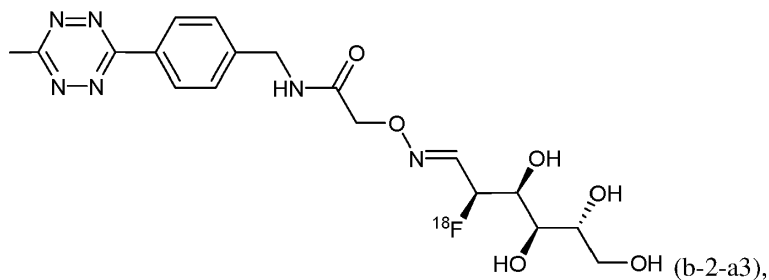
En el Esquema S1, el exceso de tetrazina-aminooxi puede capturarse al hacerlo reaccionar con otro hidrato de carbono soluble en agua. El hidrato de carbono soluble en agua puede ser glucosamina 6-sulfato.

Un compuesto de Fórmula (b) puede ser de Fórmula (b-2-a2):



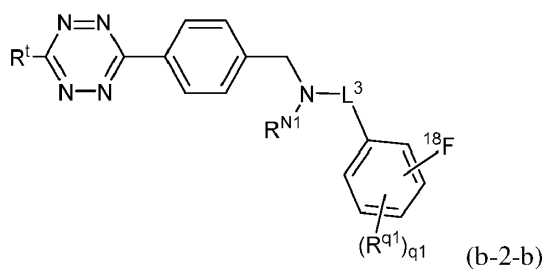
en la que  $R^t$ ,  $R^{N1}$ ,  $L^3$ ,  $R^{s1}$ ,  $R^{s2}$ ,  $R^{s3}$  y  $R^{s4}$  son como se definen aquí.

Un compuesto de Fórmula (b) puede ser de Fórmula (b-2-a3):



en la que  $R^t$ ,  $R^{N1}$ ,  $L^3$ ,  $R^{s1}$ ,  $R^{s2}$ ,  $R^{s3}$  y  $R^{s4}$  son como se definen aquí.

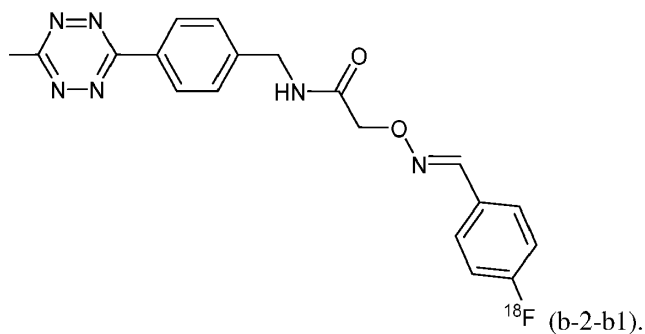
Un compuesto de Fórmula (b) puede ser de Fórmula (b-2-b):



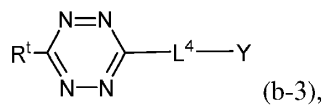
5

en la que  $R^t$ ,  $R^{N1}$ ,  $L^3$ ,  $R^{q1}$ , y  $q1$  son como se definen aquí.

Un compuesto de Fórmula (b) puede ser de Fórmula (b-2-b1):



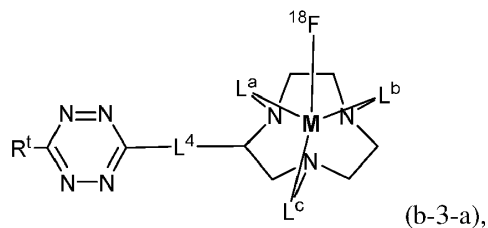
Un compuesto de Fórmula (b) puede ser de Fórmula (b-3):



10

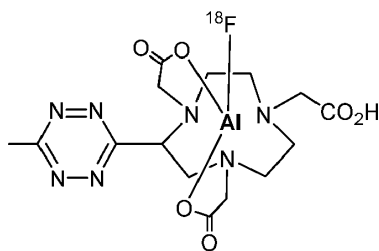
en la que  $R^t$ ,  $L^4$ , e  $Y$  son como se definen aquí.

Un compuesto de Fórmula (b) puede ser de Fórmula (b-3-a):

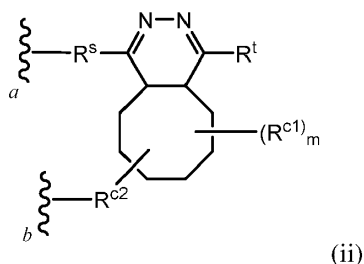


en la que  $R^t$ ,  $L^4$ ,  $L^a$ ,  $L^b$ , y  $L^c$  son como se definen aquí.

15 Un compuesto de Fórmula (b) puede ser de la siguiente fórmula:



El enlazador  $L^2$  puede ser de Fórmula (ii):

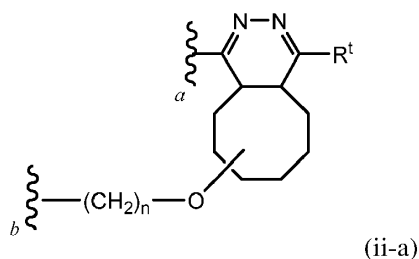


en la que

- 5  $R^t$  es hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclilo opcionalmente sustituido;
- $R^s$  es un enlace, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arileno opcionalmente sustituido, heteroarileno opcionalmente sustituido, o heterociclileno opcionalmente sustituido;
- 10 cada aparición de  $R^{c1}$  es hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclilo opcionalmente sustituido; u opcionalmente dos  $R^{c1}$  se toman con los átomos intermedios para formar un anillo carbociclilo opcionalmente sustituido, o heterociclilo opcionalmente sustituido;
- $R^{c2}$  es un enlace, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arileno opcionalmente sustituido, heteroarileno opcionalmente sustituido, o heterociclileno opcionalmente sustituido;
- 15  $m$  es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, según lo permita la valencia;
- $a$  indica el punto de unión a  $L^1$ ; y
- $b$  indica el punto de unión a  $^{18}F$ .

Según la descripción,  $m$  puede ser 0, 1, 2, 3, 4.

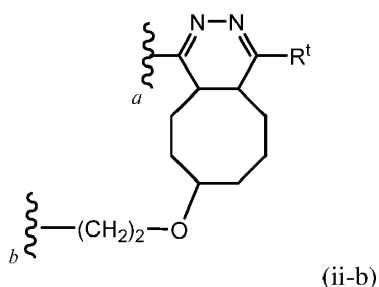
- 20 Como se define en general aquí, cada aparición de  $R^{c1}$  es independientemente hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclilo opcionalmente sustituido.  $R^{c1}$  puede ser hidrógeno.  $R^{c1}$  puede ser alifático opcionalmente sustituido.  $R^{c1}$  puede ser alquilo opcionalmente sustituido.  $R^{c1}$  puede ser heteroalifático opcionalmente sustituido. Dos  $R^{c1}$  tomados con los átomos intermedios pueden formar un carbociclilo opcionalmente sustituido. Dos  $R^{c1}$  tomados con los átomos intermedios pueden formar un ciclopropilo opcionalmente sustituido.
- 25 Como se define en general aquí,  $R^{c2}$  es un enlace, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arileno opcionalmente sustituido, heteroarileno opcionalmente sustituido, o heterociclileno opcionalmente sustituido.  $R^{c2}$  puede ser un enlace.  $R^{c2}$  puede ser alifático opcionalmente sustituido.  $R^{c2}$  puede ser alquilo opcionalmente sustituido.  $R^{c2}$  puede ser heteroalifático opcionalmente sustituido.  $R^{c2}$  puede ser alcoxi opcionalmente sustituido.  $R^{c2}$  puede ser un grupo amino opcionalmente sustituido.
- 30 El enlazador  $L^2$  puede ser de Fórmula (ii-a):



en la que  $n$  es un número entero entre 1 y 8, inclusive.

Según la descripción,  $n$  puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.

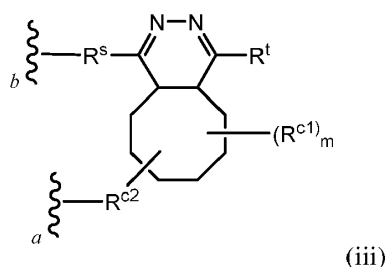
El enlazador  $L^2$  puede ser de Fórmula (ii-b):



5

en la que  $n$  es un número entero entre 1 y 8, inclusive.

El enlazador  $L^2$  puede ser de fórmula (iii):



en la que

10  $R^t$  es hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclilo opcionalmente sustituido;

$R^s$  es un enlace, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arileno opcionalmente sustituido, heteroarileno opcionalmente sustituido, o heterociclileno opcionalmente sustituido;

15 cada aparición de  $R^{c1}$  es hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclilo opcionalmente sustituido;

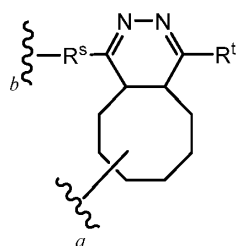
$R^{c2}$  es un enlace, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arileno opcionalmente sustituido, heteroarileno opcionalmente sustituido, o heterociclileno opcionalmente sustituido;

$m$  es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, según lo permita la valencia;

$a$  indica el punto de unión a  $L^1$ ; y

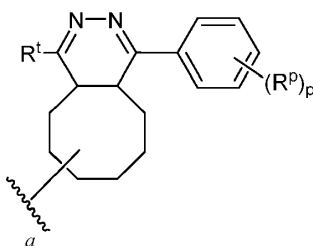
20  $b$  indica el punto de unión a  $^{18}F$ .

El enlazador  $L^2$  es de Fórmula (iii-a):



(iii-a).

-L<sup>2</sup>-F<sup>18</sup> puede ser de Fórmula (iii-b):



(iii-b)

en la que

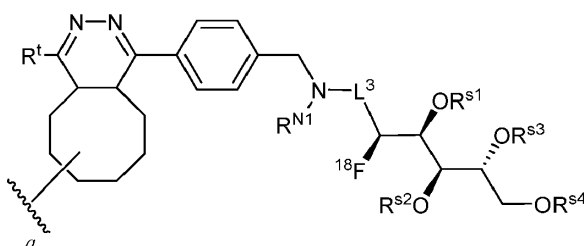
- 5 cada aparición de R<sup>p</sup> es independientemente hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, hidroxilo, o amino opcionalmente sustituido; con la condición de que al menos un R<sup>p</sup> no sea hidrógeno y comprenda F<sup>18</sup>; y

p es 1, 2, 3, 4 o 5.

- 10 Según la descripción, p puede ser 1, 2, 3, 4, 5.

Como se define en general aquí, R<sup>p</sup> es hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, hidroxilo, o amino opcionalmente sustituido; en el que al menos un R<sup>p</sup> no es hidrógeno y comprende F<sup>18</sup>. R<sup>p</sup> puede ser hidrógeno. R<sup>p</sup> puede ser alifático opcionalmente sustituido. R<sup>p</sup> puede ser alquilo de C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido. R<sup>p</sup> puede ser alquilo de C<sub>1-6</sub> no sustituido. R<sup>p</sup> puede ser metilo o etilo. R<sup>p</sup> puede ser alquilo de C<sub>1-6</sub> sustituido. R<sup>p</sup> puede ser arilo opcionalmente sustituido. R<sup>p</sup> puede ser fenilo opcionalmente sustituido. R<sup>p</sup> puede ser heteroarilo opcionalmente sustituido. R<sup>p</sup> puede ser piridina opcionalmente sustituida. Al menos un R<sup>p</sup> puede no ser hidrógeno y puede comprender F<sup>18</sup>.

-L<sup>2</sup>-F<sup>18</sup> puede ser de Fórmula (iii-b1):



(iii-b1)

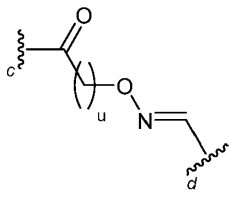
en la que

L<sup>3</sup> es un enlace, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arileno opcionalmente sustituido, heteroarileno opcionalmente sustituido, o heterociclileno opcionalmente sustituido;

R<sup>N1</sup> es independientemente hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido, o un grupo protector de nitrógeno; y

cada uno de R<sup>s1</sup>, R<sup>s2</sup>, R<sup>s3</sup> y R<sup>s4</sup> es independientemente hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido, o un grupo protector de oxígeno.

Como se define en general aquí,  $L^3$  es un enlace, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arileno opcionalmente sustituido, heteroarileno opcionalmente sustituido, o heterociclileno opcionalmente sustituido.  $L^3$  puede ser un enlace.  $L^3$  puede ser alifático opcionalmente sustituido.  $L^3$  puede ser heteroalifático opcionalmente sustituido.  $L^3$  puede comprender un resto de oxima.  $L^3$  puede ser de fórmula



5

en la que  $c$  indica el punto de unión a  $-N-R^{N1}$ ;  $d$  indica el punto de unión a  $-CH^{18}F$ ; y  $u$  es 1, 2, 3, 4 o 5.  $L^3$  puede ser  $C=O$ .

$R^{N1}$  puede ser independientemente hidrógeno.  $R^{N1}$  puede ser alifático opcionalmente sustituido.  $R^{N1}$  puede ser alquilo opcionalmente sustituido.  $R^{N1}$  puede ser un grupo protector de amino.

10  $R^{s1}$  puede ser independientemente hidrógeno.  $R^{s1}$  puede ser alifático opcionalmente sustituido.  $R^{s1}$  puede ser alquilo opcionalmente sustituido.  $R^{s1}$  puede ser un grupo protector de oxígeno.  $R^{s1}$  puede ser acilo (por ejemplo, acetilo).

$R^{s2}$  puede ser independientemente hidrógeno.  $R^{s2}$  puede ser alifático opcionalmente sustituido.  $R^{s2}$  puede ser alquilo opcionalmente sustituido.  $R^{s2}$  puede ser un grupo protector de oxígeno.  $R^{s2}$  puede ser acilo (por ejemplo, acetilo).

15  $R^{s3}$  puede ser independientemente hidrógeno.  $R^{s3}$  puede ser alifático opcionalmente sustituido.  $R^{s3}$  puede ser alquilo opcionalmente sustituido.  $R^{s3}$  puede ser un grupo protector de oxígeno.  $R^{s3}$  puede ser acilo (por ejemplo, acetilo).

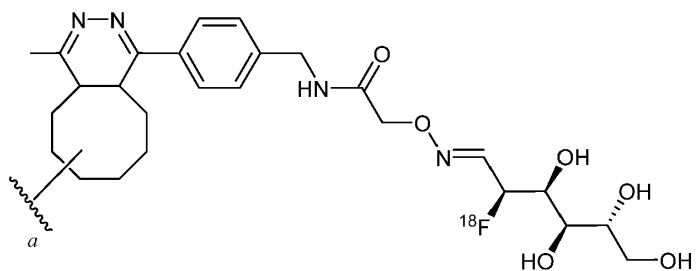
$R^{s4}$  puede ser independientemente hidrógeno.  $R^{s4}$  puede ser alifático opcionalmente sustituido.  $R^{s4}$  puede ser alquilo opcionalmente sustituido.  $R^{s4}$  puede ser un grupo protector de oxígeno.  $R^{s4}$  puede ser acilo (por ejemplo, acetilo).

$R^{s1}$ ,  $R^{s2}$ ,  $R^{s3}$  y  $R^{s4}$  pueden ser todos hidrógeno.

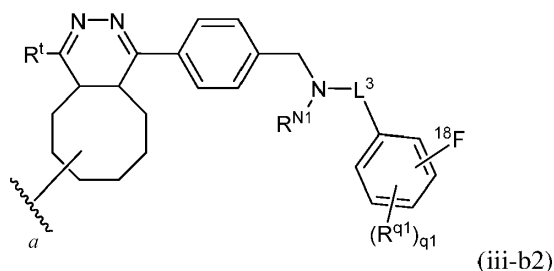
$R^{N1}$ ,  $R^{s1}$ ,  $R^{s2}$ ,  $R^{s3}$  y  $R^{s4}$  pueden ser todos hidrógeno.

20  $R^{N1}$ ,  $R^{s1}$ ,  $R^{s2}$ ,  $R^{s3}$  y  $R^{s4}$  pueden ser todos hidrógeno; y  $R^t$  puede ser alifático opcionalmente sustituido.  $R^{N1}$ ,  $R^{s1}$ ,  $R^{s2}$ ,  $R^{s3}$  y  $R^{s4}$  pueden ser todos hidrógeno; y  $R^t$  puede ser alquilo de  $C_{1-6}$  opcionalmente sustituido.  $R^{N1}$ ,  $R^{s1}$ ,  $R^{s2}$ ,  $R^{s3}$  y  $R^{s4}$  pueden ser todos hidrógeno; y  $R^t$  puede ser metilo o etilo.

$-L^2-F^{18}$  puede ser de la fórmula:



25  $-L^2-F^{18}$  puede ser de Fórmula (iii-b2):



en la que

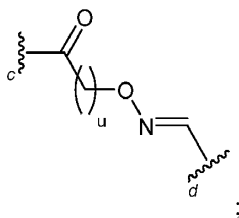
$L^3$  es un enlace, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arileno opcionalmente sustituido, heteroarileno opcionalmente sustituido, o heterociclileno opcionalmente sustituido;

R<sup>N1</sup> es independientemente hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido, o un grupo protector de nitrógeno;

cada aparición de  $R^{q1}$  es independientemente hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, hidroxilo, o amino opcionalmente sustituido; y

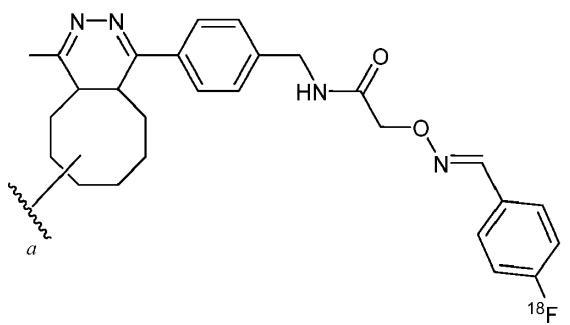
q1 es 0, 1, 2, 3 o 4.

R<sup>1</sup> puede ser alifático opcionalmente sustituido, y R<sup>q1</sup> puede ser hidrógeno. R<sup>1</sup> puede ser alquilo de C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido; L<sup>3</sup> es

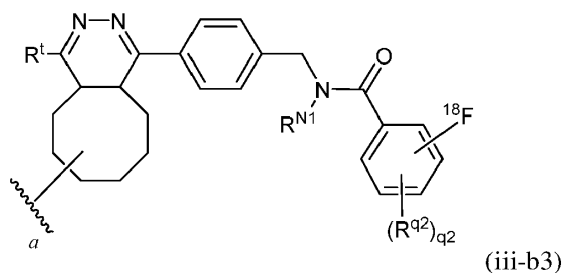


u es 1; y  $R^{q1}$  es hidrógeno.

-L<sup>2</sup>-F<sup>18</sup> puede ser de la fórmula:



$-L^2-F^{18}$  puede ser de Fórmula (iii-b3):



(iii-b3)

en la que

R<sup>N1</sup> es independientemente hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido, o un grupo protector de nitrógeno; y

cada aparición de R<sup>q2</sup> es independientemente hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, carbociclilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, heterociclilo opcionalmente sustituido, hidroxilo, o amino opcionalmente sustituido; y

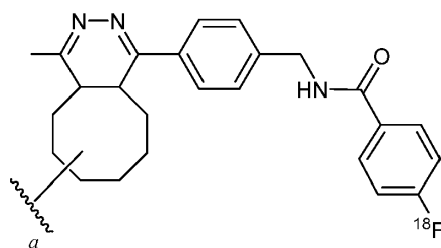
$q_2$  es 0, 1, 2, 3 o 4.

Según la descripción, q2 puede ser 0, 1, 2, 3, 4.

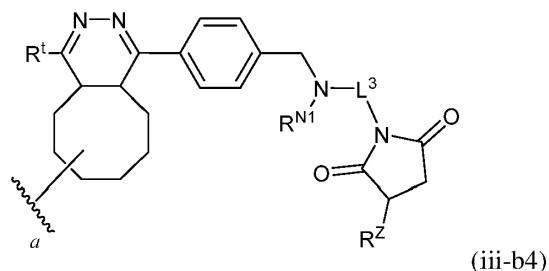
R<sup>q2</sup> puede ser hidrógeno. R<sup>q2</sup> puede ser alifático opcionalmente sustituido. R<sup>q2</sup> puede ser alquilo de C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido.

R<sup>t</sup> puede ser alifático opcionalmente sustituido, y R<sup>q2</sup> puede ser hidrógeno.

-L<sup>2</sup>-F<sup>18</sup> puede ser de la fórmula:



-L<sup>2</sup>-F<sup>18</sup> puede ser de Fórmula (iii-b4):



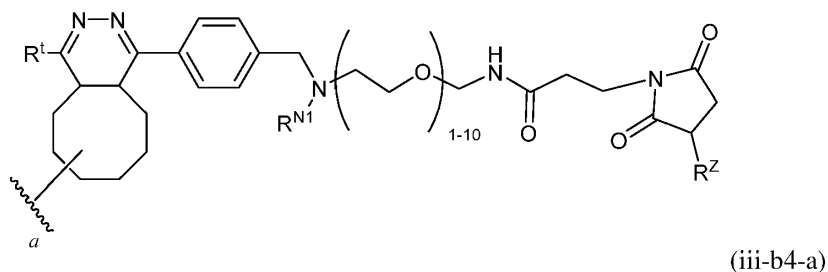
en la que

5 L<sup>3</sup> es un enlace, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arileno opcionalmente sustituido, heteroarileno opcionalmente sustituido, o heterociclileno opcionalmente sustituido;

R<sup>N1</sup> es independientemente hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido, o un grupo protector de nitrógeno; y

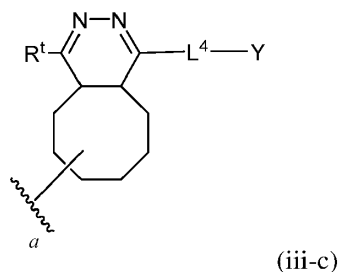
10 R<sup>Z</sup> es independientemente hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido, en la que R<sup>Z</sup> comprende <sup>18</sup>F.

-L<sup>2</sup>-F<sup>18</sup> puede ser de Fórmula (iii-b4-a):



R<sup>Z</sup> puede ser un tiol opcionalmente sustituido.

-L<sup>2</sup>-F<sup>18</sup> puede ser de Fórmula (iii-c):



en la que

Y es un ligando capaz de quelarse a un complejo metálico farmacéuticamente aceptable que comprende F<sup>18</sup>; y

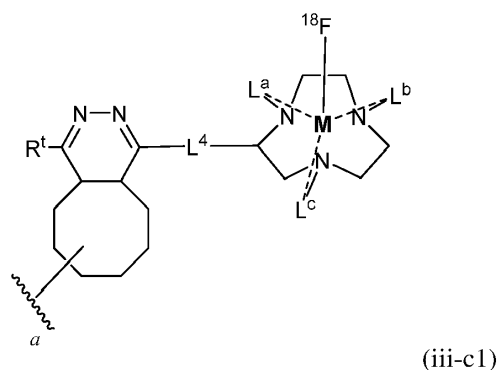
20 L<sup>4</sup> es un enlace, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arileno opcionalmente sustituido, cicloalquileno opcionalmente sustituido, heteroarileno opcionalmente sustituido, o heterociclileno opcionalmente sustituido.

Como se define en general aquí, Y es un ligando capaz de quelarse a un complejo metálico farmacéuticamente aceptable que comprende  $F^{18}$ . Como se usa aquí, un ligando se refiere a un ion o molécula (grupo funcional) que se une a un átomo metálico central para formar un complejo de coordinación. El enlace entre el metal y el ligando generalmente implica la donación formal de uno o más de los pares de electrones del ligando. La naturaleza del enlace metal-ligando puede oscilar de covalente a iónica. Los ejemplos de ligandos monodentados incluyen, pero no se limitan a, CO, organonitrilos (por ejemplo,  $CH_3CN$ ,  $CH_3CH_2CN$ ), aminas monosustituidas, aminas disustituidas, aminas trisustituidas, heterociclos (por ejemplo, piridina, piperidina), dialquilcianamidas, óxido de trifenilfosfina, THF, DMF, o NMF. Los ejemplos de ligandos bidentados incluyen, pero no se limitan a, 1,5-ciclooctadieno, norbornadieno, 1,2-etilendiamina, tetrametiletilendiamina, 1,2-dimetoxietano, diglima, o 2,5-ditiahexano. Los ejemplos de ligandos tridentados incluyen, pero no se limitan a, trieno cíclico conjugado (por ejemplo, cicloheptatrieno), trieno acíclico conjugado, arenos (por ejemplo, benceno, tolueno, xileno, mesitileno, naftaleno), tetraazamacrociclos (por ejemplo, tetraazaciclododecano), poliaminas (por ejemplo, dietilentriamina), y tritiociclononano. El ligando puede ser un ligando polidentado. El ligando puede comprender ácido 1,4,7-triazaciclononano-triacético (NOTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-tetraacético (DOTA), o triazaciclononano-fosfinato (TRAP).

La frase "farmacéuticamente aceptable" significa que el complejo metálico es adecuado para la administración a un sujeto. El complejo metálico puede ser un complejo metálico de haluro. El metal puede ser un metal farmacéuticamente aceptable. El metal puede ser un metal del grupo IIA o IIIA. El metal puede ser un metal de transición temprano. El metal puede ser Al.

$L^4$  puede ser un enlace.  $L^4$  puede ser alifático opcionalmente sustituido.  $L^4$  puede ser heteroalifático opcionalmente sustituido.

$-L^2-F^{18}$  puede ser de Fórmula (iii-c1):



en la que

M es un metal farmacéuticamente aceptable;

cada uno de  $L^a$ ,  $L^b$ , y  $L^c$  es independientemente alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arileno opcionalmente sustituido, cicloalquileo opcionalmente sustituido, heteroarileno opcionalmente sustituido, o heterociclileno opcionalmente sustituido; y

"---" indica un enlace de coordinación o está ausente, según lo permita la valencia.

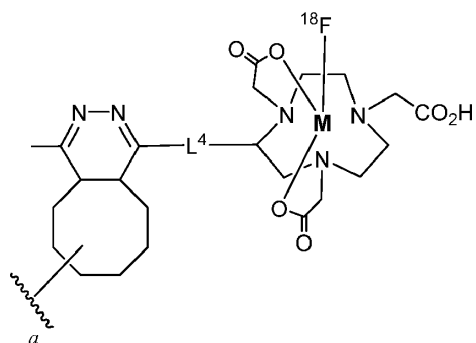
$L^a$  puede ser alifático opcionalmente sustituido.  $L^a$  puede ser heteroalifático opcionalmente sustituido.  $L^a$  puede ser heteroalquileo opcionalmente sustituido.  $L^a$  puede ser  $-(CH_2)_{1-3}-C(=O)O^-$ , en el que el punto de quelación a M es O.  $L^a$  puede ser  $-CH_2-C(=O)O^-$ .  $L^a$  puede ser  $-(CH_2)_{1-3}-C(=O)OH$ , en el que el punto de quelación a M es O.  $L^a$  puede ser  $-CH_2-C(=O)OH$ .

$L^b$  puede ser alifático opcionalmente sustituido.  $L^b$  puede ser heteroalifático opcionalmente sustituido.  $L^b$  puede ser heteroalquileo opcionalmente sustituido.  $L^b$  puede ser  $-(CH_2)_{1-3}-C(=O)O^-$ , en el que el punto de quelación a M es O.  $L^b$  puede ser  $-CH_2-C(=O)O^-$ .  $L^b$  puede ser  $-(CH_2)_{1-3}-C(=O)OH$ , en el que el punto de quelación a M es O.  $L^b$  puede ser  $-CH_2-C(=O)OH$ .

$L^c$  puede ser alifático opcionalmente sustituido.  $L^c$  puede ser heteroalifático opcionalmente sustituido.  $L^c$  puede ser heteroalquileo opcionalmente sustituido.  $L^c$  puede ser  $-(CH_2)_{1-3}-C(=O)O^-$ , en el que el punto de unión a M es O.  $L^c$  puede ser  $-CH_2-C(=O)O^-$ .  $L^c$  puede ser  $-(CH_2)_{1-3}-C(=O)OH$ , en el que el punto de quelación a M es O.  $L^c$  puede ser  $-CH_2-C(=O)OH$ .

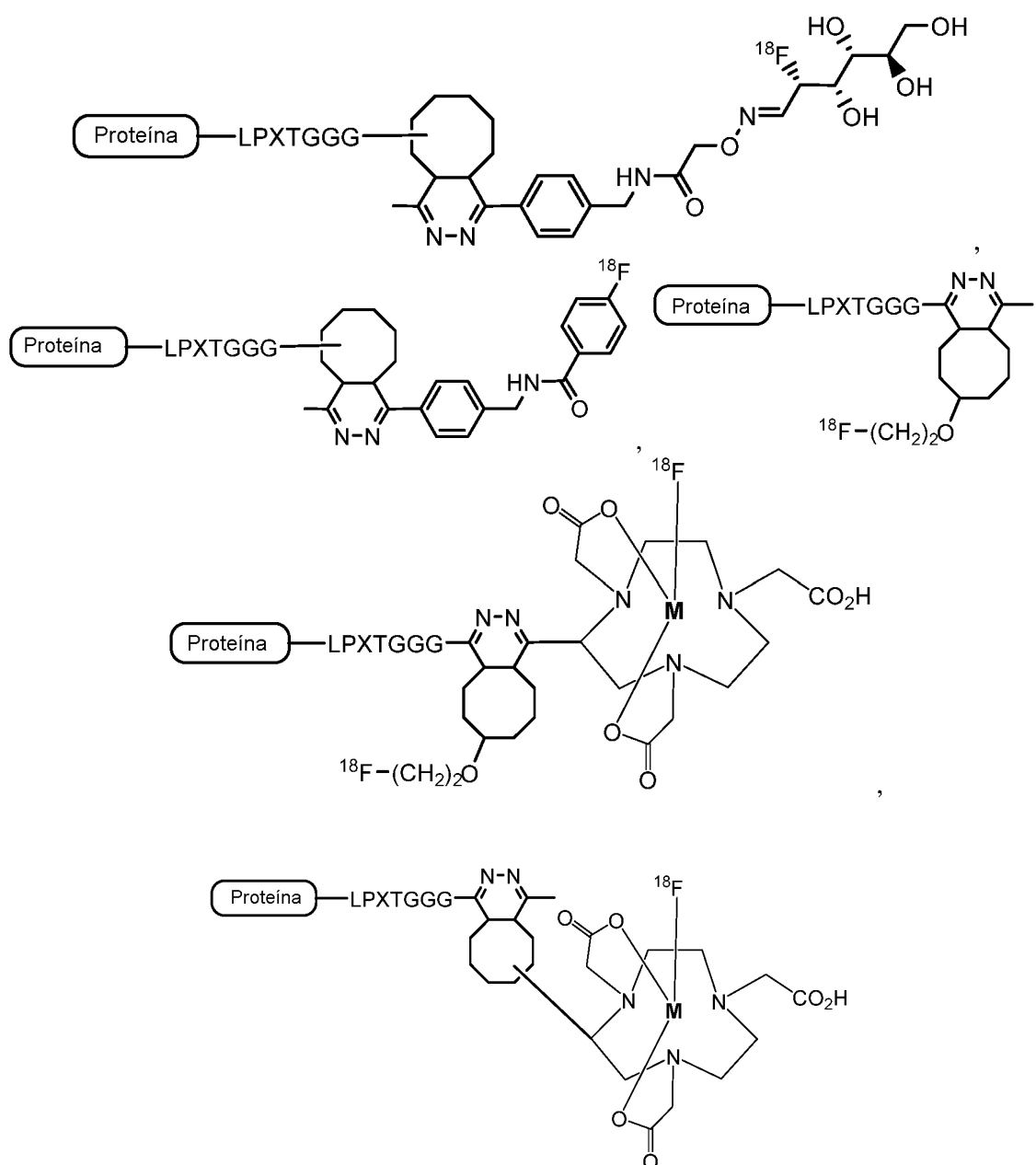
Como se define en general aquí, "---" indica la quelación formada entre M y el ligando, según lo permita la valencia. M puede formar un enlace quelante con el ligando. M puede formar dos enlaces quelantes con el ligando. M puede formar tres enlaces quelantes con el ligando.

-L<sup>2</sup>-F<sup>18</sup> puede ser de Fórmula (iii-c2):



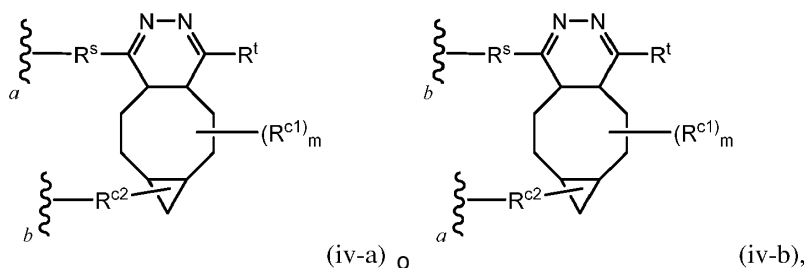
(iii-c2).

La proteína radiactiva puede ser una de las siguientes fórmulas:



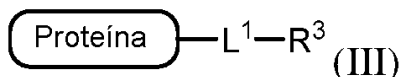
o

El enlazador L<sup>2</sup> puede ser de una de las siguientes fórmulas:



en las que  $R^s$ ,  $R^t$ ,  $R^{c1}$ ,  $R^{c2}$ , y  $m$  son como se definen aquí.

Se proporciona aquí una proteína radiactiva de Fórmula (III)

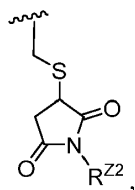


5 en la que

$L^1$  es como se define aquí; y

$R^3$  comprende un ligando capaz de quelarse a un complejo de metal radiactivo farmacéuticamente aceptable.

$L^1-R^3$  puede ser de la siguiente fórmula:



10 en la que  $R^{Z2}$  es alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido, o un grupo protector de nitrógeno; en la que  $R^{Z2}$  comprende un ligando capaz de quelarse a un complejo de metal radiactivo farmacéuticamente aceptable.

$R^3$  puede comprender un ligando monodentado.  $R^3$  puede comprender un ligando polidentado.  $R^3$  puede comprender ácido 1,4,7-triazaciclononano-triacético (NOTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-tetraacético (DOTA) o triazaciclononano-fosfinato (TRAP).

El metal puede ser  $^{64}\text{Cu}^{2+}$ . El metal puede ser  $^{68}\text{Ga}^{3+}$ .

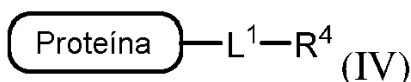
La proteína radiactiva puede ser una de las siguientes fórmulas:



o



Se proporciona aquí una proteína radiactiva de Fórmula (IV)



en la que

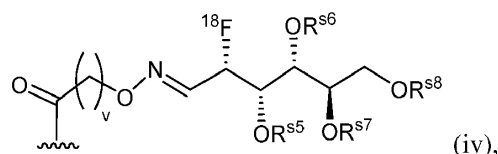
$L^1$  es un enlazador que comprende al menos cuatro aminoácidos formado por conjugación enzimática entre dos secuencias de reconocimiento de enzimas;

$R^4$  comprende un hidrato de carbono radiactivo opcionalmente sustituido; y

$R^4$  está unido al extremo C del aminoácido adyacente en  $L^1$ .

Como se define en general aquí,  $R^4$  comprende un hidrato de carbono radiactivo opcionalmente sustituido.  $R^4$  puede comprender una glucosa radiactiva opcionalmente sustituida.  $R^4$  puede comprender una glucosa radiactiva que comprende  $^{18}\text{F}$ .  $R^4$  puede comprender una glucosa opcionalmente sustituida que comprende  $^{18}\text{F}$ .  $R^4$  puede estar unido al extremo C del aminoácido adyacente en  $L^1$ .  $R^4$  puede estar unido a la cadena lateral del aminoácido adyacente en  $L^1$ .

$R^4$  puede ser de Fórmula (iv):



en la que

$v$  es 1, 2, 3, 4 o 5; y

- 10 cada uno de  $R^{S5}$ ,  $R^{S6}$ ,  $R^{S7}$  y  $R^{S8}$  es independientemente hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido, o un grupo protector de oxígeno.

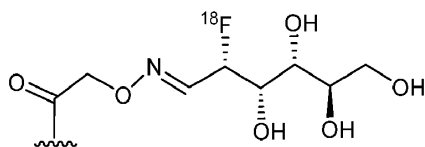
$R^{S5}$  puede ser independientemente hidrógeno.  $R^{S5}$  puede ser alifático opcionalmente sustituido.  $R^{S5}$  puede ser alquilo opcionalmente sustituido.  $R^{S5}$  puede ser un grupo protector de oxígeno.  $R^{S5}$  puede ser acilo (por ejemplo, acetilo).

- 15  $R^{S6}$  puede ser independientemente hidrógeno.  $R^{S6}$  puede ser alifático opcionalmente sustituido.  $R^{S6}$  puede ser alquilo opcionalmente sustituido.  $R^{S6}$  puede ser un grupo protector de oxígeno.  $R^{S6}$  puede ser acilo (por ejemplo, acetilo).

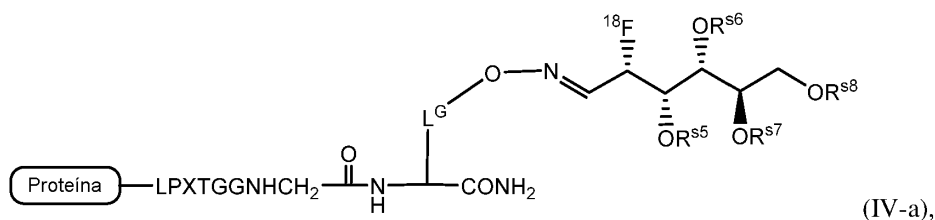
$R^{S7}$  puede ser independientemente hidrógeno.  $R^{S7}$  puede ser alifático opcionalmente sustituido.  $R^{S7}$  puede ser alquilo opcionalmente sustituido.  $R^{S7}$  puede ser un grupo protector de oxígeno.  $R^{S7}$  puede ser acilo (por ejemplo, acetilo).

- 20  $R^{S8}$  puede ser independientemente hidrógeno.  $R^{S8}$  puede ser alifático opcionalmente sustituido.  $R^{S8}$  puede ser alquilo opcionalmente sustituido.  $R^{S8}$  puede ser un grupo protector de oxígeno.  $R^{S8}$  puede ser acilo (por ejemplo, acetilo).

$R^4$  puede ser de la fórmula:

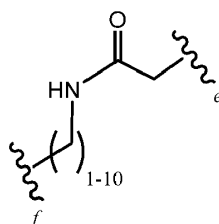


La proteína radiactiva puede ser de la siguiente fórmula:



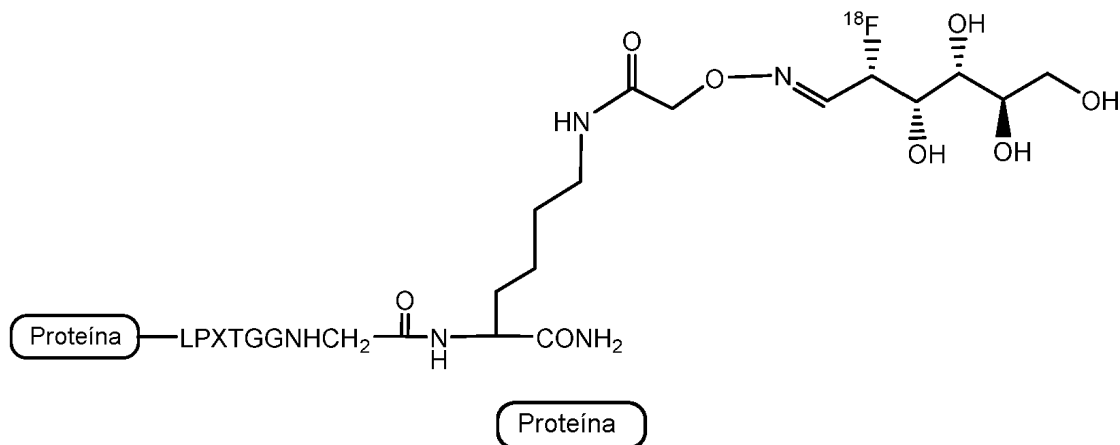
- 25 en la que  $R^{S5}$ ,  $R^{S6}$ ,  $R^{S7}$  y  $R^{S8}$  son como se definen aquí; y  $L^G$  es alifático opcionalmente sustituido o heteroalifático opcionalmente sustituido.

$L^G$  puede ser alifático opcionalmente sustituido.  $L^G$  puede ser alquilo de  $C_{1-10}$  opcionalmente sustituido.  $L^G$  puede ser heteroalifático opcionalmente sustituido.  $L^G$  puede ser de la fórmula:



- 30 en la que  $e$  indica el punto de unión al oxígeno y  $f$  indica el punto de unión al carbono alfa del aminoácido.

La proteína radiactiva puede ser de la siguiente fórmula:



- 5 puede ser un anticuerpo, un factor nuclear, un neuropéptido, una proteína receptora, una enzima, una proteína estructural, o un fragmento de los mismos.

Proteína

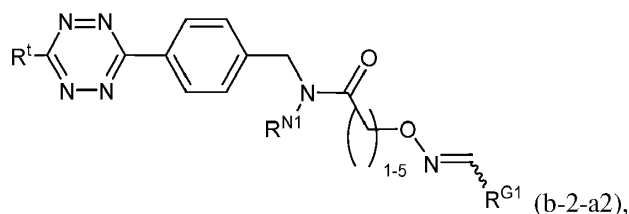
puede ser un anticuerpo o un fragmento del mismo.

Proteína

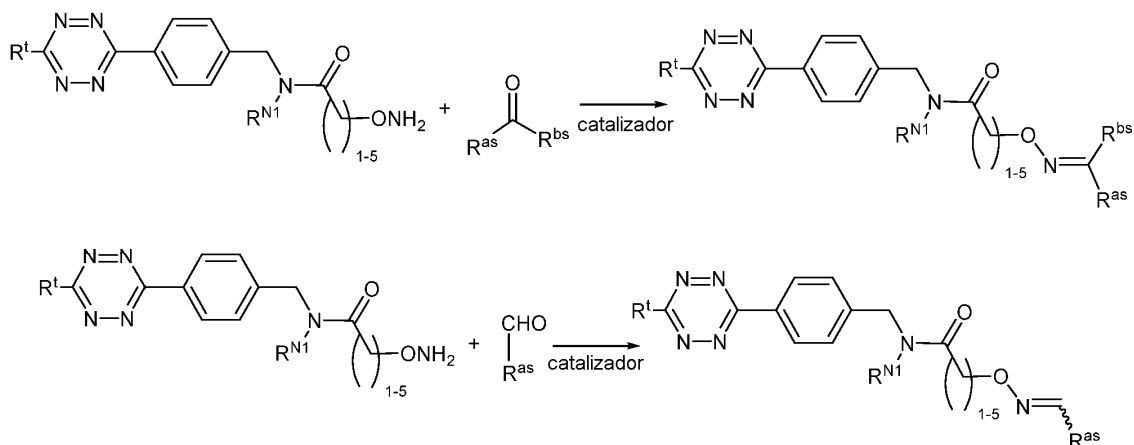
puede ser VHH o un fragmento del mismo.

- 10 Síntesis de intermedios y proteínas radiomarcadas

Los compuestos de oxima de Fórmula (b-2-a2)



- 15 se pueden preparar a partir de tetrazina-aminoxí opcionalmente sustituida y un aldehído opcionalmente sustituido o una cetona opcionalmente sustituida radiomarcados de fórmula  $R^{as}.CO-R^{bs}$ , en la que  $R^{G1}$  es como se define aquí; cada uno de  $R^{as}$  y  $R^{bs}$  es independientemente hidrógeno, alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido, o heterociclilo opcionalmente sustituido; con la condición de que  $R^{as}$  y  $R^{bs}$  no sean ambos hidrógeno (Esquema S1).



Esquema S1.

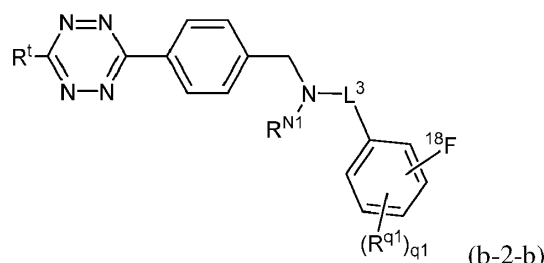
$R^{as}$  puede ser un grupo hidrato de carbono opcionalmente sustituido o un fragmento del mismo.  $R^{as}$  puede ser una glucosa opcionalmente sustituida o un fragmento de la misma. La reacción se puede llevar a cabo en presencia de un catalizador, el catalizador puede ser m-fenilendiamina, p-fenilendiamina, o p-anisidina. El catalizador puede ser m-fenilendiamina. La relación molar de la tetrazina-aminooxi opcionalmente sustituida al catalizador puede ser de alrededor de 10:1 a 1:10. La relación molar de la tetrazina-aminooxi opcionalmente sustituida al catalizador puede ser de alrededor de 1:1 a 1:8. La relación molar de la tetrazina-aminooxi opcionalmente sustituida al catalizador puede ser de alrededor de 1:1 a 1:6. La relación molar de la tetrazina-aminooxi opcionalmente sustituida al catalizador puede ser de alrededor de 1:2 a 1:4. La relación molar de la tetrazina-aminooxi opcionalmente sustituida al catalizador puede ser de alrededor de 1:4.

- 10  $R^{as}$  puede ser un grupo hidrato de carbono opcionalmente sustituido o un fragmento del mismo, con la condición de que  $R^{as}$  comprenda  $^{18}F$ .  $R^{as}$  puede ser una glucosa opcionalmente sustituida o un fragmento de la misma.  $R^{as}$  tal vez  $^{18}F$ -FDG o un fragmento de la misma.

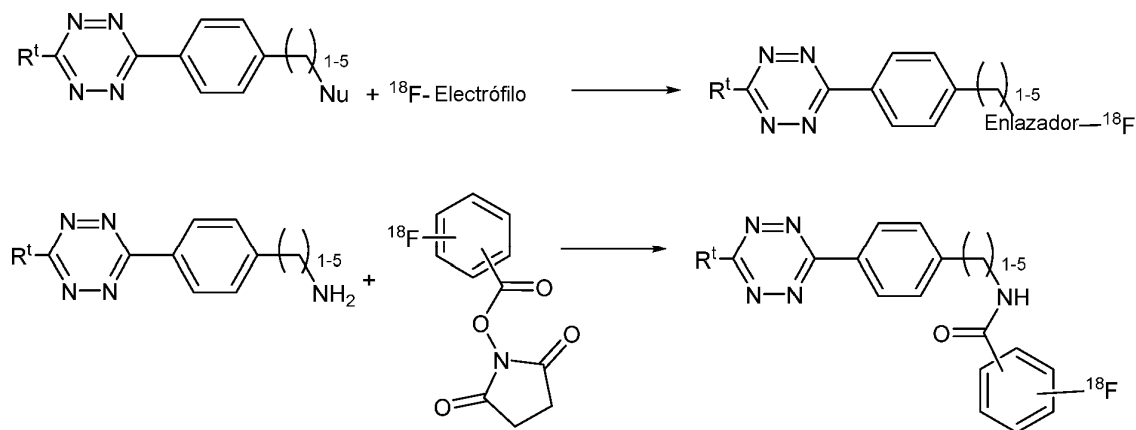
Como se proporciona en el Esquema S1, el producto de oxima resultante se puede purificar fácilmente de la mezcla de reacción hasta el cambio de hidrofilia.

- 15 En el Esquema S1, el exceso de tetrazina-aminooxi puede capturarse haciéndolo reaccionar con otro hidrato de carbono soluble en agua. El hidrato de carbono soluble en agua puede ser glucosamina 6-sulfato.

El compuesto de Fórmula (b-2-b)

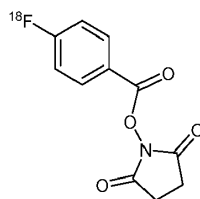


- 20 se puede preparar haciendo reaccionar una tetrazina opcionalmente sustituida que comprende un grupo nucleófilo con un electrófilo que comprende  $^{18}F$ , tal como  $^{18}F$ -SFB. La síntesis ejemplar de Fórmula (b-2-b) se proporciona en el Esquema S2.



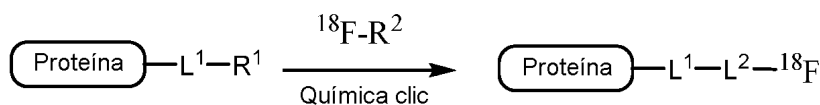
Esquema S2

El Nu puede ser un grupo amino. El electrófilo puede ser un N-succinimidilo opcionalmente sustituido que comprende  $^{18}F$ . El N-succinimidilo opcionalmente sustituido puede ser  $^{18}F$ -SFB de la fórmula



La síntesis ejemplar de  $^{18}F$ -SFB se puede encontrar en la Figura 11.

La proteína radiactiva de Fórmula (II) se puede preparar a partir de una proteína modificada de Fórmula (I) con un compuesto de Fórmula (b):  $^{18}\text{F}\text{-R}^2$  (b), en la que  $\text{R}^2$  es un grupo reactivo capaz de sufrir la reacción de química de clic (Esquema S3):



Esquema S3.

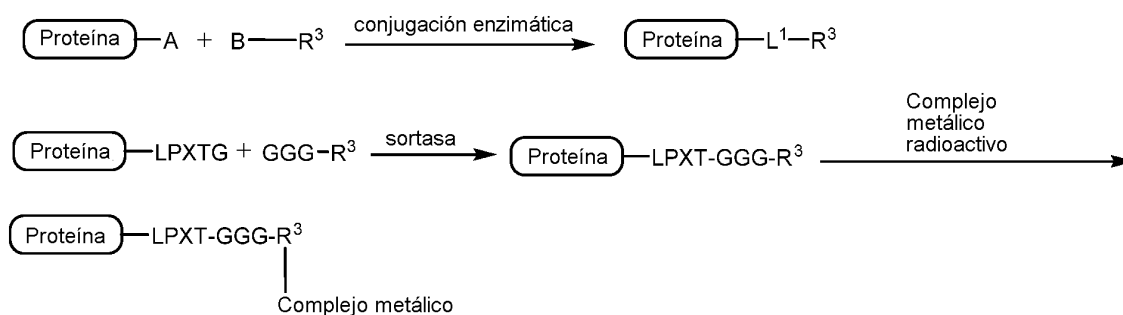
- 5 R<sup>1</sup> puede ser la primera asa de la química de clic, y R<sup>2</sup> es la segunda asa de química de clic. R<sup>2</sup> puede ser la primera asa de la química de clic, y R<sup>1</sup> es la segunda asa de química de clic.

La química de clic debe ser modular, de amplio alcance, brindar altos rendimientos químicos, generar subproductos inofensivos, ser estereoespecífica, ser fisiológicamente estable, exhibir una gran fuerza impulsora termodinámica (por ejemplo,  $> 84$  kJ/mol, para favorecer una reacción con un solo producto de reacción), y/o tener una alta economía atómica. Se han identificado varias reacciones que se ajustan a este concepto:

- 15 (1) La cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen (por ejemplo, la variante por etapas catalizada por Cu(I), a menudo denominada simplemente “reacción de clic”; véase, por ejemplo, Tornøe et al., Journal of Organic Chemistry (2002) 67: 3057-3064). El cobre y el rutenio son los catalizadores comúnmente usados en la reacción. El uso de cobre como catalizador da como resultado la formación del regioisómero 1,4, mientras que el rutenio da como resultado la formación del regioisómero 1,5;
- (2) Otras reacciones de cicloadición, tal como la cicloadición de Diels-Alder;
- (3) Adición nucleófila a pequeños anillos tensos como epóxidos y aziridinas;
- (4) Adición nucleófila a grupos carbonilo activados; y
- (4) Reacciones de adición a enlaces dobles o triples carbono-carbono.

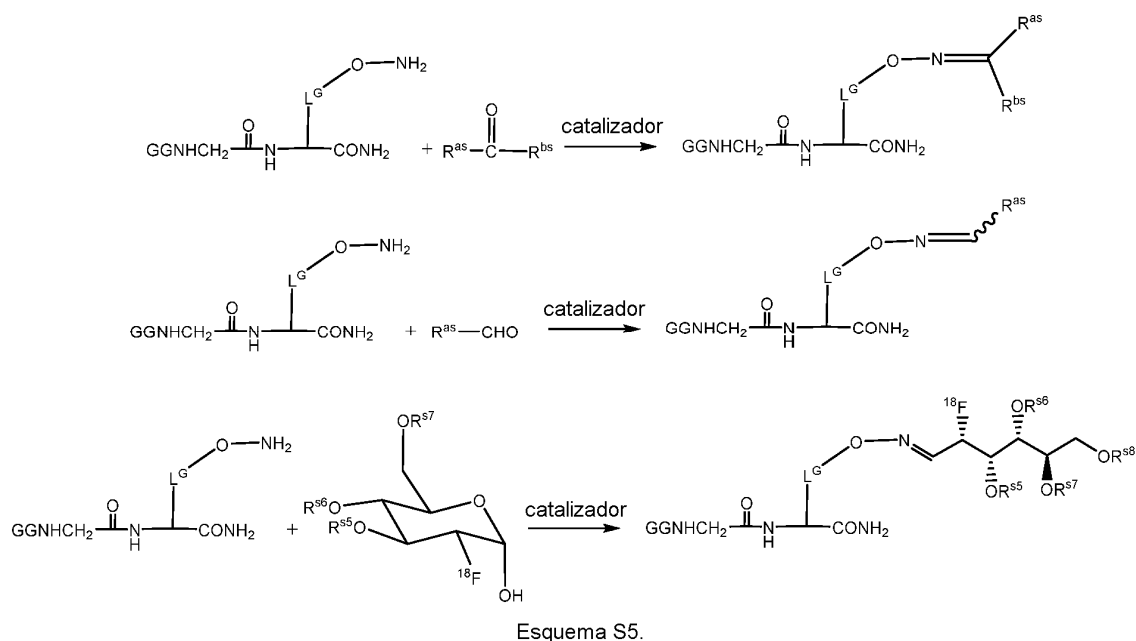
- 20 La química de clic puede ser una cicloadición de Diels-Alder. Ejemplos de cicloadiciones de Diels-Alder se pueden encontrar en la publicación de patente U.S. n.º 20130266512;

La proteína radiactiva de Fórmula (III) se puede preparar a partir de un compuesto que comprende un resto aminooxi con un aldehído opcionalmente sustituido (Esquema S4):



Esquema S4.

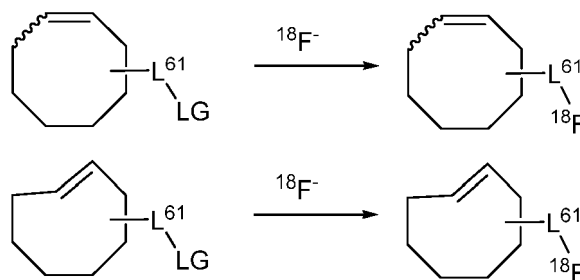
- 25 La proteína radiactiva de Fórmula (IV) se puede preparar a partir de un compuesto que comprende un resto aminooxi con un aldehído opcionalmente sustituido o una cetona opcionalmente sustituida (Esquema S5), en el que L<sup>G</sup> es como se define aquí.



El aldehído puede ser un hidrato de carbono opcionalmente sustituido que comprende un grupo aldehído o es capaz de formar uno mediante isomería. El aldehído opcionalmente sustituido puede ser un monosacárido opcionalmente sustituido. El aldehído opcionalmente sustituido puede ser glucosa opcionalmente sustituida, gliceraldehído opcionalmente sustituido, o galactosa opcionalmente sustituida. El aldehído opcionalmente sustituido puede ser glucosa opcionalmente sustituida.

El catalizador puede ser *m*-fenilendiamina (mPDA), *o*-fenilendiamina, *p*-fenilendiamina, *o*-aminofenol, *m*-aminofenol, *p*-aminofenol, ácido *o*-aminobenzoico, ácido 5-metoxiantranílico, ácido 3,5-diaminobenzoico, o anilina. El catalizador puede ser *m*-fenilendiamina (mPDA).

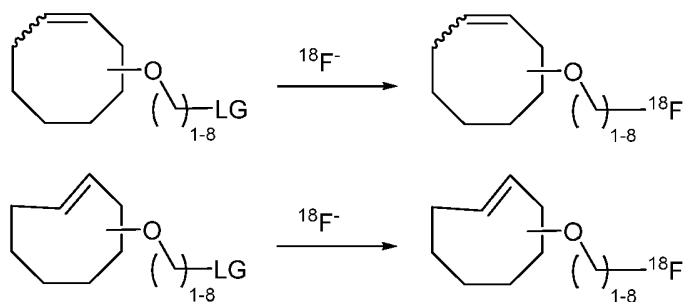
- 10 El cicloocteno radiactivo opcionalmente sustituido se puede sintetizar mediante una reacción nucleófila con un anión de  $^{18}\text{F}$  con un cicloocteno sustituido que comprende un grupo saliente LG (Esquema S6), en el que LG es como se define aquí, y  $\text{L}^{61}$  es alifático opcionalmente sustituido, heteroalifático opcionalmente sustituido, arileno opcionalmente sustituido, heteroarileno opcionalmente sustituido, o heterociclileno opcionalmente sustituido.



Esquema S6

- 15  $\text{L}^{61}$  puede ser heteroalifático opcionalmente sustituido.  $\text{L}^{61}$  puede ser heteroalifático de cadena lineal.  $\text{L}^{61}$  puede ser -O-alkileno de  $\text{C}_{1-8}$ .  $\text{L}^{61}$  puede ser  $-\text{O}-(\text{CH}_2)_{1-8}-$ .

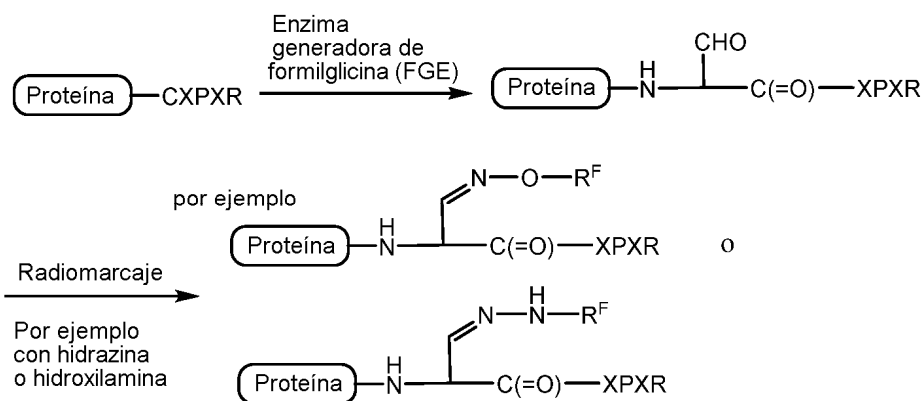
El cicloocteno radiactivo opcionalmente sustituido se puede sintetizar como se muestra en el Esquema S6-a, en el que  $\text{L}^{61}$  es como se define aquí.



Esquema S6-a

El anión  $^{18}\text{F}^-$  puede ser de una sal inorgánica que comprende anión  $^{18}\text{F}^-$ . El anión  $^{18}\text{F}^-$  puede ser de una sal de metal que comprende anión  $^{18}\text{F}^-$ . El anión  $^{18}\text{F}^-$  puede ser de fluoruro metálico IA, IIA o IIIA. El anión  $^{18}\text{F}^-$  puede provenir de un complejo de metal de transición que comprende  $^{18}\text{F}^-$ .

- 5 La conjugación enzimática puede ser una modificación que usa una enzima generadora de formilglutina (FGE). La proteína puede ser un anticuerpo. La enzima puede ser FGE. La secuencia de reconocimiento de FGE puede ser CXPXR. La secuencia de reconocimiento de FGE puede ser LCTPSRGSFLTGR. La proteína radiactiva se puede preparar según el Esquema E1.



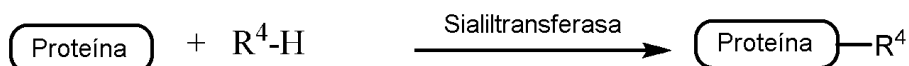
- 10 R<sup>F</sup> un grupo reactivo capaz de sufrir una reacción de química de clic, que comprende un hidrato de carbono radioactivo opcionalmente sustituido, o que comprende un ligando capaz de quelarse a un complejo metálico radioactivo farmacéuticamente aceptable.

X = un aminoácido independiente.

### Esquema E1

- 15 Debe entenderse que el grupo -CHO generado a partir de la modificación FGE puede experimentar cualquier reacción adecuada para incorporar un marcador radiactivo, por ejemplo un asa de química de clic, un hidrato de carbono radiactivo, o un ligando capaz de quelarse a un complejo metálico radiactivo farmacéuticamente aceptable. En el Esquema E1 se muestran ejemplos de transformaciones, tal como la reacción con hidrazina o hidroxilamina.

- 20 La conjugación enzimática puede ser una modificación que usa sialiltransferasas. La proteína puede ser un polipéptido de superficie celular. La proteína puede ser un glicano. En el Esquema E2 se muestra una sialilación ejemplar, en el que R<sup>4</sup> es como se define aquí.

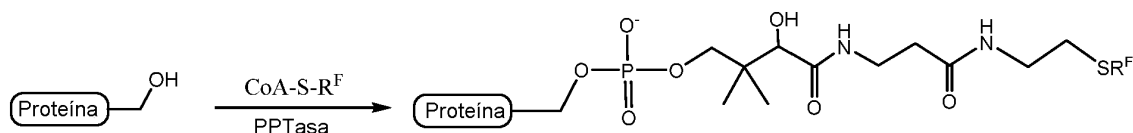


R<sup>4</sup> comprende un hidrato de carbono radioactivo opcionalmente sustituido

### Esquema E2

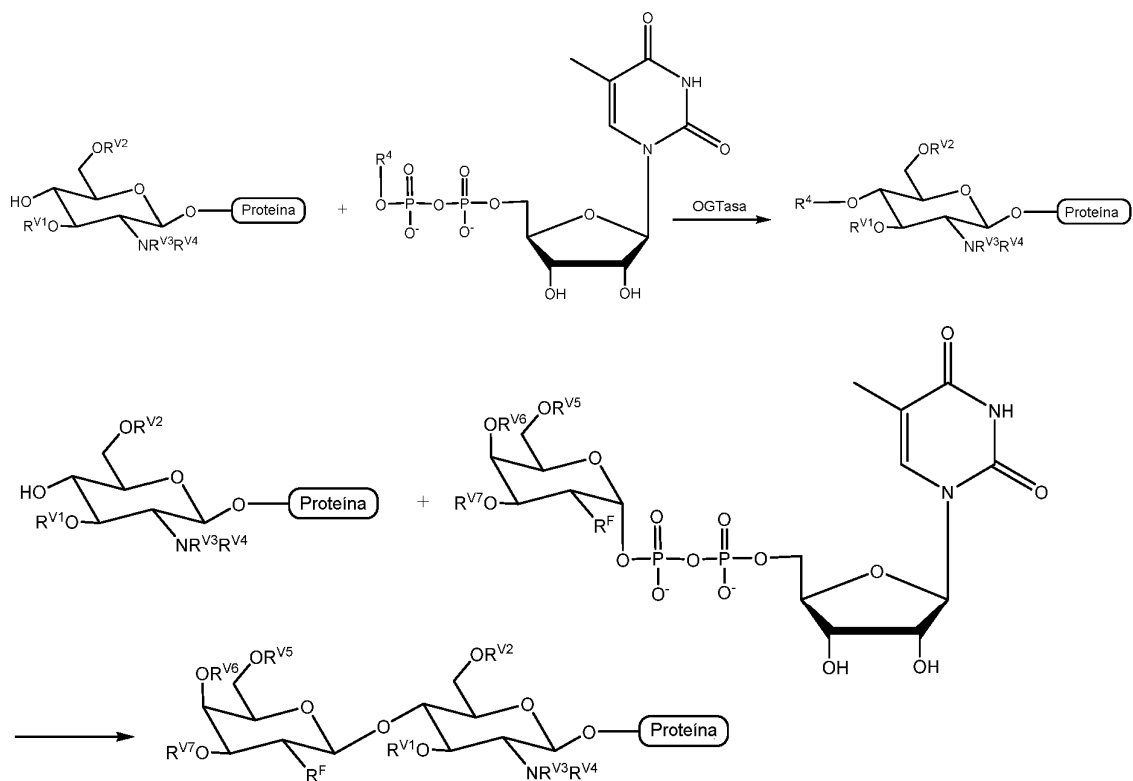
$R^4$  puede comprender glucosa radiactiva opcionalmente sustituida.  $R^4$  puede comprender  $^{18}\text{F}$ -FDG.  $R^4$  puede comprender aldolasa radiactiva opcionalmente sustituida.  $R^4$  puede comprender manosa radiactiva opcionalmente sustituida.

- 5 La conjugación enzimática puede ser una modificación que usa fosfopanteteiniltransferasas (PPTasas). La proteína puede ser una proteína portadora de péptidos (PCP). La proteína puede ser una proteína portadora de acilo (ACP). La secuencia de reconocimiento de PPT puede comprender un resto de serina. La secuencia de reconocimiento de PPTasa puede ser DSLEFIASKLA, VLDSLEFIASKLA, o GSQDVLSLEFIASKLA. La fosfopanteteiniltransferasa puede ser Sfp. En el Esquema E3 se muestra una modificación ejemplar que usa PPTasa, en el que  $R^F$  es como se define aquí.



Esquema E3

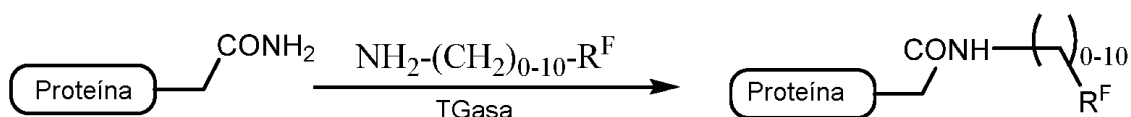
La conjugación enzimática puede ser una modificación que usa polipeptidiltransferasas (OGTasas). La proteína puede ser una proteína de poro nuclear. La OGTasa puede ser UDP-Glc-Nac. La secuencia de reconocimiento de OGTasa puede comprender un resto de serina o un resto de treonina. Las modificaciones ejemplares que usan polipeptidiltransferasas se muestran en el Esquema E4, en el que  $R^F$  es como se define aquí.



Cada uno de  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ , y  $R^7$  es independientemente H, alquilo de C1-6 opcionalmente sustituido, o un grupo protector de oxígeno

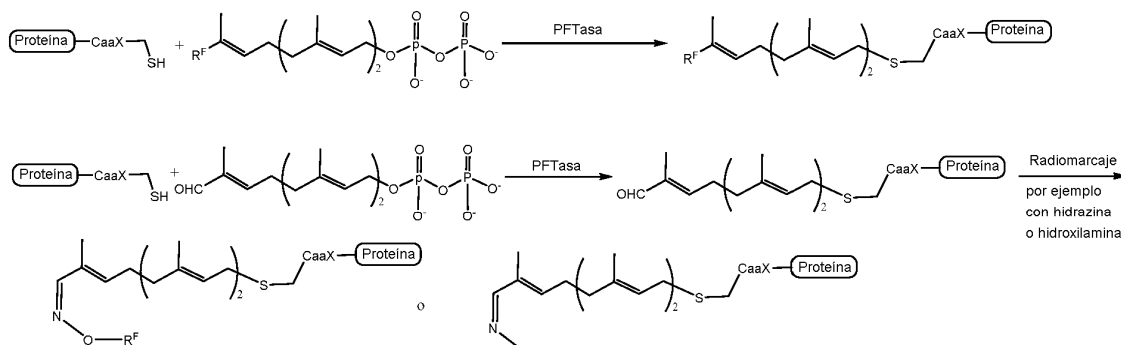
Esquema E4

- 20 La conjugación enzimática puede ser una modificación que usa transglutaminasa (TGasas). La proteína puede ser un anticuerpo. La secuencia de reconocimiento de TGasa puede comprender un resto de glutamina (Q). La secuencia de reconocimiento de TGasa puede comprender XXQXX. La secuencia de reconocimiento de proteína puede ser GGGSLQ, PNPQLPF, PKPQQFM, o GQQQLG. La secuencia de reconocimiento de proteína puede comprender un resto de lisina (K). La secuencia de reconocimiento de proteína puede ser MRHKGS. En el Esquema E5 se muestra una modificación ejemplar que usa TGasas, en el que  $R^F$  es como se define aquí.



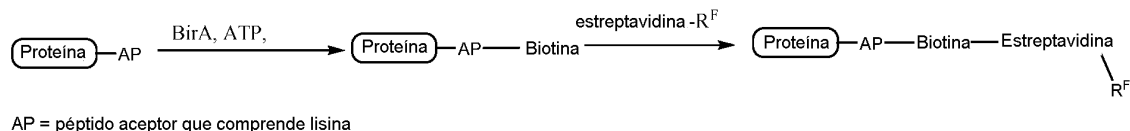
Esquema E5

La conjugación enzimática puede ser una modificación que usa proteína farnesiltransferasa (PFTasa). La proteína puede ser un anticuerpo. La secuencia de reconocimiento de PFTasa puede comprender CaaX, en la que cada aparición de a es independientemente un aminoácido alifático, y X es como se define aquí. Las modificaciones ejemplares que usan PFTasas se muestran en el Esquema E6, en el que R<sup>F</sup> es como se define aquí.



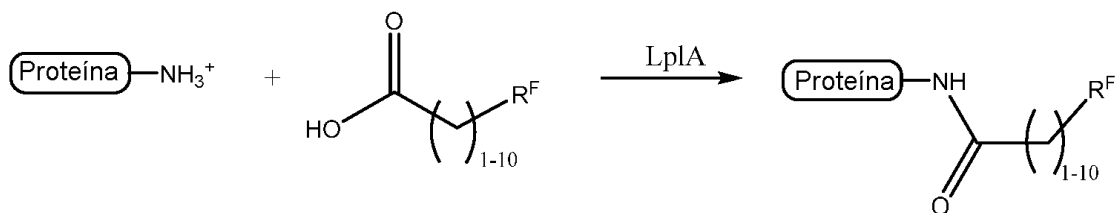
Esquema E6

La conjugación enzimática puede ser una modificación que usa biotina ligasas. La proteína puede ser un anticuerpo. La secuencia de reconocimiento de biotina ligasa puede comprender lisina (K). La secuencia de reconocimiento de biotina ligasa puede comprender GLNDIFEAQKIEWHE. La enzima puede ser biotina ligasa de *E. coli*, BirA. En el Esquema E7 se muestra una modificación ejemplar que usa biotina ligasas, en el que R<sup>F</sup> es como se define aquí.



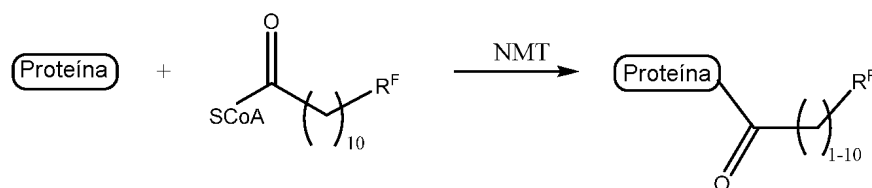
Esquema E7

La conjugación enzimática puede ser una modificación que usa ácido lipoico ligasas (LpIAs). La proteína puede ser un anticuerpo. La proteína puede ser un receptor del factor de crecimiento. La secuencia de reconocimiento de LpIA puede comprender GFEIDKVWYDLDA. La enzima puede ser Lpl de *E. coli*. Una modificación ejemplar que usa LpIAs se muestra en el Esquema E8, en el que R<sup>F</sup> es como se define aquí.



Esquema E8

La conjugación enzimática puede ser una modificación que usa N-miristoiltransferasa (NMT). La proteína puede ser un anticuerpo. La proteína puede ser una tirosina cinasa. La proteína puede ser una proteína matriz del VIH-1. La proteína puede ser una VIH Gag. La proteína puede ser un factor de ribosilación de ADP. La secuencia de reconocimiento de NMT puede comprender GXXXS/T, en la que X es cualquier aminoácido. En el Esquema E9 se muestra una modificación ejemplar que usa NMT, en el que R<sup>F</sup> es como se define aquí.



Esquema E9

R<sup>F</sup> puede ser un grupo reactivo capaz de sufrir una reacción de química de clic. R<sup>F</sup> puede ser R<sup>1</sup> como se define aquí. R<sup>F</sup> puede ser tetrazina opcionalmente sustituida. R<sup>F</sup> puede ser tetrazina opcionalmente sustituida que comprende <sup>18</sup>F. R<sup>F</sup> puede ser tetrazina opcionalmente sustituida que comprende <sup>18</sup>F-FDG o un fragmento del mismo. R<sup>F</sup> puede ser tetrazina opcionalmente sustituida que comprende <sup>18</sup>F-SFB o un fragmento del mismo. R<sup>F</sup> puede ser cicloocteno opcionalmente sustituido. R<sup>F</sup> puede ser trans-cicloocteno opcionalmente sustituido. R<sup>F</sup> puede ser trans-cicloocteno opcionalmente sustituido que comprende <sup>18</sup>F. R<sup>F</sup> puede comprender un ligando capaz de quelarse a un complejo metálico radiactivo farmacéuticamente aceptable. R<sup>F</sup> puede ser R<sup>3</sup> como se define aquí. R<sup>F</sup> puede comprender un ligando capaz de quelarse a un complejo metálico farmacéuticamente aceptable que comprende F<sup>18</sup>. R<sup>F</sup> puede ser Y como se define aquí. R<sup>F</sup> comprende un hidrato de carbono radiactivo opcionalmente sustituido. R<sup>F</sup> puede ser R<sup>4</sup> como se define aquí. R<sup>F</sup> comprende <sup>18</sup>F-FDG o un fragmento del mismo.

## EJEMPLOS

Con el fin de que la descripción descrita aquí pueda entenderse más completamente, se exponen los siguientes ejemplos. Los ejemplos descritos en esta solicitud se ofrecen para ilustrar los métodos, composiciones y sistemas proporcionados aquí, y no deben interpretarse de ninguna manera como limitativos de su alcance.

### Ejemplo 1. Marcaje dual de anticuerpos mediado por enzimas para formación de imágenes multimodales y para manipular sus características.

Las estructuras de los VHH muestran que su extremo C está alejado del sitio de unión al antígeno<sup>[13]</sup>. Por lo tanto, se escogió un enfoque químico para unir dos VHH completamente funcionales a través de sus extremos C para garantizar que su capacidad de unión al antígeno no se viera comprometida por la modificación de uno de los extremos N en la fusión resultante, y que los dos sitios de unión así creados fuesen equivalentes, lo que puede ser más difícil de determinar para las fusiones genéticas.

Se diseñaron y sintetizaron cuatro sustratos de sortasa para la producción de dímeros o de VHH PEGilados (Figura 1). Los sustratos contienen dos asas bioortogonales o un asa y un fluoróforo. El sustrato marcado con Alexa647 se diseñó de tal manera que los productos de reacción pudieran usarse en experimentos FACS para estimar las afinidades de unión relativas *in vitro*. El sustrato modificado con Rojo Texas fue diseñado para permitir la microscopía de dos fotones, y para estimar las afinidades de unión *in vivo* relativas; el sustrato modificado con TCO se produjo para permitir la instalación rápida de una etiqueta radiactiva funcionalizada con tetrazina para PET, en este caso una etiqueta radioactiva de tetrazina marcada con <sup>18</sup>F marcada isotópicamente para PET (t<sub>1/2</sub>=110 min. <sup>18</sup>F t<sub>1/2</sub><2 h). Los dímeros se produjeron como se ejemplifica en la Figura 2. Para DC8 (anti Clase II), los esplenocitos se tiñeron con diferentes concentraciones de monómeros y dímeros, y se analizaron mediante FACS. Para DC 13 (anti CD11b), se usó la línea de células dendríticas mutuDC CD11b<sup>+</sup>. Para MHC Clase II y CD11b, los dímeros VHH se unen aproximadamente 3,3 y 2,3 veces mejor que sus monómeros correspondientes, respectivamente (Figura 3). Se evaluaron las características de unión *in vivo* de los dímeros de VHH frente a los monómeros. Debido a la expresión más abundante de moléculas MHC Clase II en los esplenocitos en comparación con la de CD11b, se exploró la afinidad de unión *in vivo* por los dímeros anti-Clase II. Los ratones se inyectaron i.v. con cantidades iguales de monómeros y dímeros (0,25 nmol) de DC8. 2 h p.i., se sacrificó a los ratones, y se extirparon los órganos linfoides para examinarlos. Los monómeros y dímeros produjeron diferentes patrones de tinción (Figura 3B), mostrando el dímero una tinción intercalada aún más pronunciada que el monómero, lo que corrobora los resultados de FACS. Para hacer que los monómeros y dímeros sean adecuados para inmuno-PET, se produjeron VHH de dímero usando el sustrato 4. Para producir la <sup>18</sup>F-tetrazina, se aplicó un método que se automatizó en sus etapas clave para minimizar la exposición a la radiación del operador durante la preparación (Figura 4A). Se produjeron dímeros anti-Clase II y anti-CD11b marcados con <sup>18</sup>F, y se aplicaron a imágenes de PET (Figura 4). La PET mostró que ambos dímeros tiñeron los órganos linfoides (Figura 4). El dímero anti MHC Clase II mostró una tinción más fuerte de los órganos linfoides, particularmente el bazo, en comparación con el dímero anti CD11b. (Figuras 4D y 4F). Esto puede atribuirse al hecho de que en el bazo hay menos células CD11b<sup>+</sup> en comparación con células MHC Clase II<sup>+</sup>, y menos CD11b expresado por célula. La especificidad se estableció bloqueando las dianas de estos VHH mediante la introducción de VHH no marcados, como competidores, antes de la formación de imágenes. Las imágenes de PET realizadas 2 h p.i. de los VHH marcados con <sup>18</sup>F mostraron un bloqueo eficaz de la señal en los órganos linfoides, lo que subraya aún más la especificidad de los dímeros en ausencia de VHH competitivos, se tomaron imágenes de ratones MHC II<sup>-/-</sup> y CD11b<sup>-/-</sup>. No se detectaron señales de PET en los órganos linfoides, lo que confirma aún más la especificidad de ambos dímeros (Figuras 4E-4G). Los monómeros y los dímeros no difieren en la absorción en los riñones y el intestino, órganos comúnmente atacados de manera no específica por los VHH

durante su eliminación<sup>[14]</sup>. Estos experimentos ayudaron a preparar el escenario para explorar la capacidad de los dímeros de VHH para obtener imágenes de tumores. Se tomaron imágenes de dos tipos de tumores con los VHH bivalentes desarrollados mediante injerto de ratones con el melanoma B16 o la línea celular de tumor pancreático panc02. Ambos dímeros detectaron fácilmente los órganos linfoides, así como el tumor de melanoma B16 o el injerto panc02. Tras la escisión, los tumores panc no tenían más de ~1-2 mm de diámetro, lo que muestra que el método es sensible. El análisis de biodistribución post mortem se correlacionó bien con el FACS, y también con los resultados de dos fotones (Figuras 5A-5B). Se examinó si la vida media circulatoria podría manipularse para mejorar aún más la relación señal/ruido. La PEGilación de los VHH da como resultado un aumento de la vida media circulatoria, en el que el aumento se correlaciona con el tamaño del grupo PEG adjunto<sup>[15]</sup>. Los VHH clasificados con el sustrato 2 o 3 se hicieron reaccionar con PEG funcionalizado con DBCO (5 kDa, 10 kDa o 20 kDa) para producir los VHH PEGilados finales (Figuras 2E-2F). Los ratones B6 recibieron 5 µg de VHH PEGilado, y se sacrificaron 3 h más tarde, seguido de la disección de los ganglios linfáticos y del bazo para FACS y microscopía de dos fotones. FACS mostró un aumento significativo en la tinción del DC8-Alexa647 PEGilado frente al DC8 no PEGilado. Se observó un aumento aproximado del 30%, 100% y 220% en la tinción para DC8 conjugado con PEG de 5 kDa, 10 kDa o 20 kDa, respectivamente, lo que estableció una correlación entre el tamaño del resto de PEG unido y su eficiencia de tinción (Figura 3D). Cuando se inyectaron DC8-Alexa647-PEG-20kDa, que mostró la unión más fuerte *in vivo*, en un ratón MHC II<sup>-/-</sup>, el análisis FACS no mostró tinción en el bazo (Figura 3D). Esto confirmó que la PEGilación no afecta la especificidad de los VHH.

Se exploró la idoneidad de los VHH PEGilados en las imágenes de PET. VHH DC8 se PEGiló y modificó con un radionúclido <sup>18</sup>F. Los VHH PEGilados mostraron una mayor tinción de los órganos linfoides, lo que confirma FACS y microscopía de dos fotones. (Figura 5D). La vida media circulatoria más larga de los VHH PEGilados puede aumentar la probabilidad de que un VHH se una a su diana, siempre que la PEGilación no comprometa la accesibilidad a la diana. El DC8-PEG-20 kDa marcado con <sup>18</sup>F tenía la señal de PET más alta en sangre en el momento de la imagen (3 h p.i.) (Figura 5D). Si bien el PEG de 20 kDa más grande puede aumentar significativamente la eficacia de la tinción en los órganos linfoides, puede retrasar la eliminación circulatoria, un factor a considerar cuando se usan isótopos con vidas medias cortas, tales como <sup>18</sup>F o <sup>11</sup>C. Sin embargo, un VHH modificado con PEG de 10 kDa o 5 kDa aún puede aumentar significativamente la eficacia de la tinción, y sin embargo puede eliminarse rápidamente. Para el marcaje de VHH, el uso de isótopos con vidas medias más largas, tales como <sup>89</sup>Zr o <sup>64</sup>Cu, el uso de un resto de PEG de 20 kDa, puede mejorar la tinción.

En resumen, los métodos proporcionados aquí pueden producir anticuerpos de dominio único bivalentes o PEGilados específicos del sitio equipados con un fluoróforo y/o radionúclido (<sup>18</sup>F) para las diferentes modalidades de formación de imágenes. Las condiciones de reacción son compatibles con la retención total de la actividad biológica de las parejas de fusión. Por citofluorimetría, los dímeros se unen aproximadamente 3 veces más ávidamente a sus dianas. La microscopía de dos fotones demostró que los derivados de dominio único bivalentes marcados con Rojo Texas se unen más eficientemente a sus dianas. Los VHH fluorescentes PEGilados mostraron una tinción mejorada *in vivo*, dando los sustituyentes PEG más grandes señales más fuertes en FACS. En experimentos de inmuno-PET, los VHH marcados con <sup>18</sup>F bivalentes tiñen mejor los órganos linfoides *in vivo* que los monómeros. Los VHH PEGilados marcados con <sup>18</sup>F mostraron una tinción mejorada, dando los sustituyentes de PEG de mayor peso molecular señales más fuertes. Finalmente, la inmuno-PET de dos modelos diferentes de ratones portadores de tumores mostró que el dímero DC8 y el dímero DC13 detectaron no solo órganos linfoides, sino que también mostraron la ubicación de melanoma ectópico e injertos de tumores pancreáticos tan pequeños como alrededor de 1 mm de tamaño. En general, estos datos respaldan que los derivados de anticuerpos de dominio único son una valiosa adición a los enfoques actuales de diagnóstico por imágenes y radiodiagnóstico.

#### Referencias

[1] T. Olafsen, S. J. Sirk, S. Olma, C. K.-F. Shen, A. M. Wu, *Tumor Biol.* 2012, 33, 669-677.

[2] E. J. Lipson, W. H. Sharfman, C. G. Drake, I. Wollner, J. M. Taube, R. A. Anders, H. Xu, S. Yao, A. Pons, L. Chen, et al., *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2013, 19, 462-468.

[3] T. R. Simpson, F. Li, W. Montalvo-Ortiz, M. A. Sepulveda, K. Bergerhoff, F. Arce, C. Roddie, J. Y. Henry, H. Yagita, J. D. Wolchok, et al., *J. Exp. Med.* 2013, 210, 1695-1710.

[4] R. Boellaard, M. J. O'Doherty, W. A. Weber, F. M. Mottaghy, M. N. Lonsdale, S. G. Stroobants, W. J. G. Oyen, J. Kotzerke, O. S. Hoekstra, J. Pruim, et al., *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2010, 37, 181-200.

[5] M. Rashidian, E. J. Keliher, A. M. Bilate, J. N. Duarte, G. R. Wojtkiewicz, J. T. Jacobsen, J. Cragnolini, L. K. Swee, G. D. Vitoria, R. Weissleder, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015, DOI 10.1073/pnas.1502609112.

[6] R. Tavaré, M. N. McCracken, K. A. Zettlitz, S. M. Knowles, F. B. Salazar, T. Olafsen, O. N. Witte, A. M. Wu, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014, 111, 1108-1113.

[7] M. Rashidian, E. J. Keliher, M. Dougan, P. K. Juras, M. Cavallari, G. R. Wojtkiewicz, J. T. Jacobsen, J. G. Edens, J. M. J. Tas, G. Vitoria, et al., *ACS Cent. Sci.* 2015, 150603073029009.

[8] E. C. Dijkers, T. H. Oude Munnink, J. G. Kosterink, A. H. Brouwers, P. L. Jager, J. R. de Jong, G. A. van Dongen, C. P. Schröder, M. N. Lub-de Hooge, E. G. de Vries, *Clin. Pharmacol. Ther.* 2010, 87, 586-592.

[9] M. Rashidian, E. J. Keliher, A. M. Bilate, J. Doarte, G. Wojtkiewicz, J. Jacobsen, G. Victora, R. Weissleder, H. L. Ploegh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015.

5 [10] T. De Meyer, S. Muyldermans, A. Depicker, *Trends Biotechnol.* 2014, 32, 263-270.

[11] P. Holliger, T. Prospero, G. Winter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993, 90, 6444-6448.

[12] H. Schellekens, W. E. Hennink, V. Brinks, *Pharm. Res.* 2013, 30, 1729-1734.

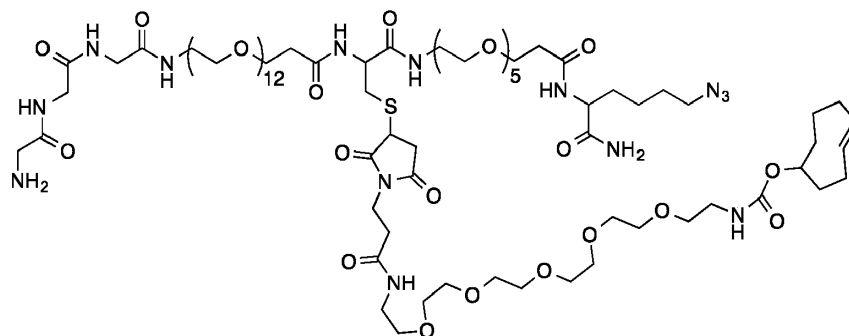
[13] E. De Genst, K. Silence, K. Decanniere, K. Conrath, R. Loris, J. Kinne, S. Muyldermans, L. Wyns, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006, 103, 4586-4591.

10 [14] V. Cortez-Retamozo, M. Lauwereys, G. Hassanzadeh Gh, M. Gobert, K. Conrath, S. Muyldermans, P. De Baetselier, H. Revets, *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 2002, 98, 456-462.

[15] Y. Vugmeyster, C. A. Entrican, A. P. Joyce, R. F. Lawrence-Henderson, B. A. Leary, C. S. Mahoney, H. K. Patel, S. W. Raso, S. H. Olland, M. Hegen, et al., *Bioconjug. Chem.* 2012, 23, 1452-1462.

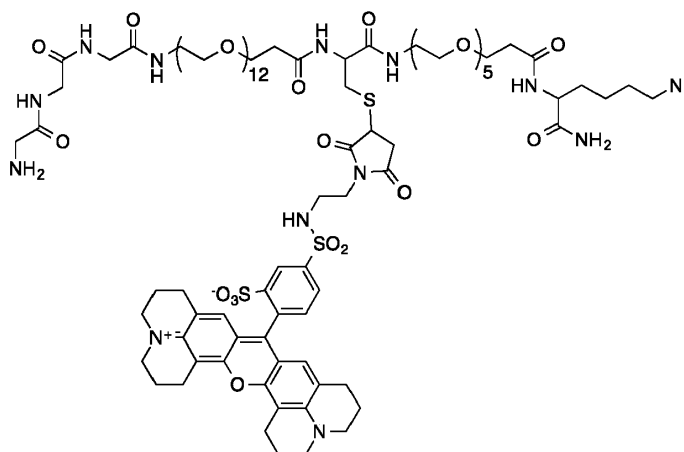
## Ejemplo 2. Materiales y Métodos

15 Síntesis de (Gly)<sub>3</sub>-PEG<sub>12</sub>-Cys(TCO)-PEG<sub>5</sub>-Lys(azida).



20 El péptido (Gly)<sub>3</sub>-PEG<sub>12</sub>-Cys-PEG<sub>5</sub>-Lys(azida) se sintetizó mediante síntesis de péptidos en fase sólida estándar. Se disolvió maleimida-TCO (de Conju-bio) en amortiguador de NaHCO<sub>3</sub> 0,05 M pH 8,3. Se añadió el péptido, y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora hasta que la LC-MS indicó una conversión casi completa al producto. La disolución se filtró y purificó por HPLC de fase inversa con una columna semipreparativa (Phenomenex, columna C<sub>18</sub>, Gemini, 5 µm, 10x250 mm) a un caudal de 5,0 ml/min.; disolvente A: ácido fórmico al 0,1% en H<sub>2</sub>O, disolvente B: ácido fórmico al 0,1% en CH<sub>3</sub>CN. El producto eluyó en 35-40% de disolvente B. Las fracciones que contenían el producto puro se recogieron y liofilizaron. LC-MS calculada para C<sub>83</sub>H<sub>151</sub>N<sub>14</sub>O<sub>34</sub>S [M+A]<sup>+</sup> 1920,0, encontrado 1919,0.

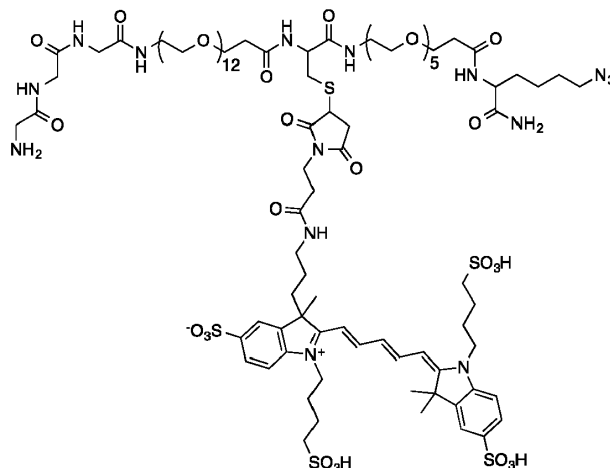
25 Síntesis de (Gly)<sub>3</sub>-PEG<sub>12</sub>-Cys(Rojo Texas)-PEGs-Lys(azida).



El péptido (Gly)<sub>3</sub>-PEG<sub>12</sub>-Cys-PEG<sub>5</sub>-Lys(azida) se sintetizó mediante síntesis de péptidos en fase sólida estándar, y se disolvió en amortiguador de NaHCO<sub>3</sub> 0,05 M pH 8,3. Se disolvió maleimide-Rojo Texas (de Vector Labs) en DMSO, y

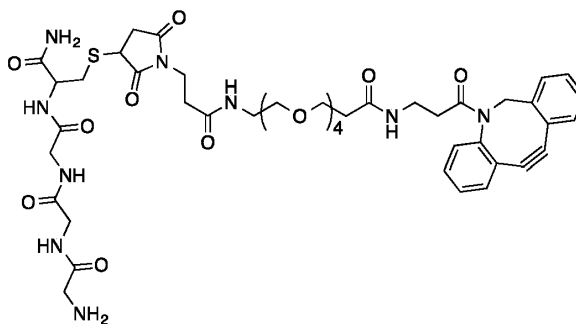
después se añadió a la disolución, y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 1 h hasta que LC-MS indicó una conversión casi completa al producto. La disolución se filtró y se purificó por HPLC de fase inversa con una columna semipreparativa (Phenomenex, columna C<sub>18</sub>, Gemini, 5 µm, 10x250 mm) a un caudal de 5,0 ml/min.; disolvente A: TFA al 0,1% en H<sub>2</sub>O, disolvente B: TFA al 0,1% en CH<sub>3</sub>CN. El producto eluyó en 40-45% de disolvente B. Las fracciones que contenían el producto puro se recogieron y se liofilizaron. LC-MS calculada para C<sub>92</sub>H<sub>142</sub>N<sub>15</sub>O<sub>32</sub>S<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 2064,9, encontrado 2063,9.

Síntesis de (Gly)<sub>3</sub>-PEG<sub>12</sub>-Cys(Alexa647)-PEG<sub>5</sub>-Lys(azida).



El péptido (Gly)<sub>3</sub>-PEG<sub>12</sub>-Cys-PEG<sub>5</sub>-Lys(azida) se sintetizó mediante síntesis de péptidos en fase sólida estándar. Se disolvió maleimide-Alexa647 (de Life Technology) en amortiguador de NaHCO<sub>3</sub> 0,05 M pH 8,3. Se añadió el péptido, y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 1 hora hasta que LC-MS indicó una conversión casi completa al producto. La disolución se filtró y se purificó por HPLC de fase inversa con una columna semipreparativa (Phenomenex, columna C<sub>18</sub>, Gemini, 5 µm, 10 x 250 mm) a un caudal de 5,0 ml/min.; disolvente A: TFA al 0,1% en H<sub>2</sub>O, disolvente B: TFA al 0,1 % en CH<sub>3</sub>CN. El producto eluyó en 30-35% de disolvente B. Las fracciones que contenían el producto puro se recogieron y se liofilizaron. LC-MS calculada para C<sub>97</sub>H<sub>158</sub>N<sub>15</sub>O<sub>39</sub>S<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 2317,9, encontrado 2318,4.

Síntesis de (Gly)<sub>3</sub>-DBCO.



El tetrapéptido (Gly)<sub>3</sub>-Cys (SEQ ID NO: 12) se sintetizó mediante síntesis de péptidos en fase sólida estándar, y se disolvió en amortiguador de NaHCO<sub>3</sub> 0,05 M pH 8,3. Se disolvió maleimida-DBCO (de Click Chemistry Tools) en DMSO, y después se añadió a la disolución, y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 1 h hasta que LC-MS indicó una conversión casi completa al producto. La disolución se filtró y se purificó por HPLC de fase inversa con una columna semipreparativa (Phenomenex, columna C<sub>18</sub>, Gemini, 5 µm, 10x250 mm) a un caudal de 5,0 ml/min.; disolvente A: TFA al 0,1% en H<sub>2</sub>O, disolvente B: TFA al 0,1% en CH<sub>3</sub>CN. El producto eluyó al 35-40% de disolvente B. Las fracciones que contenían el producto puro se recogieron y se liofilizaron. LC-MS calculada para C<sub>45</sub>H<sub>60</sub>N<sub>9</sub>O<sub>13</sub>S [M+A]<sup>+</sup> 966,4, encontrado 966,4.

Incorporación enzimática de sustratos en proteínas mediante sortasa.

Se usó la sortasa A penta-mutante, con una kcat mejorada (1). Las mezclas de reacción (1 ml) contenían Tris•HCl (50 mM, pH 7,5), CaCl<sub>2</sub> (10 mM), NaCl (150 mM), sonda que contiene triglicina (500 µM), sustrato que contiene LPETG (SEQ ID NO: 11) (100 µM), y sortasa (5 µM) (2, 3). Después de la incubación a 4°C con agitación durante 2 h, los productos de reacción se analizaron mediante LC-MS. Los rendimientos fueron generalmente > 90%. Cuando el rendimiento estuvo por debajo del 90%, se permitió que la reacción prosiguiera durante dos horas más, con adición

de sortasa a 10  $\mu$ M y sonda que contenía triglicina a 1 mM. Se añadieron perlas de Ni-NTA a la mezcla de reacción, con agitación durante 5 min a 25°C, seguido de centrifugación para eliminar la sortasa y cualquier sustrato etiquetado con His que no haya reaccionado. El producto final se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño en PBS o Tris•HCl (50 mM, pH 7,5). La proteína marcada se almacenó a -80°C con glicerol al 5% durante un máximo de seis meses.

#### Dimerización de los VHH.

El procedimiento general fue el siguiente: se añadió DBCO-VHH (1,3 eq, en PBS) a azida-X-VHH (en el que X es TCO, Rojo Texas o Alexa647), y se dejó que la reacción prosiguiera a temperatura ambiente durante ~1-3 horas con agitación constante, en la que el análisis de LC-MS reveló (generalmente) una conversión por encima del 80% en el dímero correspondiente. A continuación, el dímero se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (FPLC) usando PBS como disolvente de elución. El dímero marcado se almacenó a -80°C con glicerol al 5% durante un máximo de seis meses.

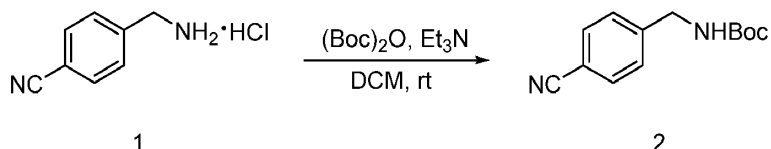
#### PEGilación de VHH.

El procedimiento general fue el siguiente: se añadió DBCO-PEG (4 eq, en PBS) a la azida-X-VHH (en el que X es TCO, Rojo Texas o Alexa647), y se dejó que la reacción prosiguiera a temperatura ambiente durante ~1-2 horas con agitación constante, en la que el análisis de SDS-PAGE reveló (generalmente) una conversión por encima del 80% en el producto PEGilado correspondiente. El producto PEGilado final se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (FPLC) usando PBS como disolvente de elución. La proteína PEGilada marcada se almacenó a -80°C con glicerol al 5% durante un máximo de seis meses.

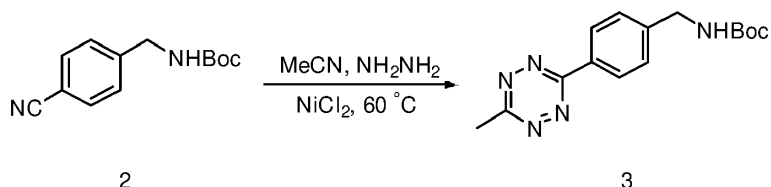
#### Imágenes de dos fotones.

La formación de imágenes de dos fotones se realizaron con el microscopio vertical Olympus BX61 (objetivo plano Olympus 25X 1.05 NA), equipado con un láser SpectraPhysics MaiTai DeepSee. Las imágenes se adquirieron usando excitación de 910 nm y los siguientes filtros; CFP (460-510), GFP (495-540), y un tercer filtro (575-630) para la señal de Rojo Texas. También se detectaron segundos armónicos (colágeno) en el filtro CFP. Las imágenes se adquirieron con una resolución Z de 5  $\mu$ m con el software Olympus FluoView FC1000. Las imágenes de mosaico se guardaron como archivos JPEG. Las imágenes se procesaron para obtener una barra de escala en Imaris v 7.4.0; no se hicieron ajustes de intensidad o contraste.

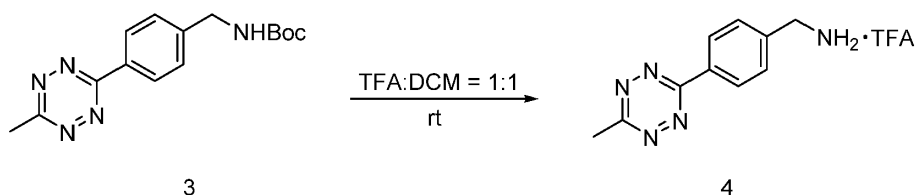
#### Síntesis y caracterización de [ $^{19}$ F]SFB-Tetrazina.



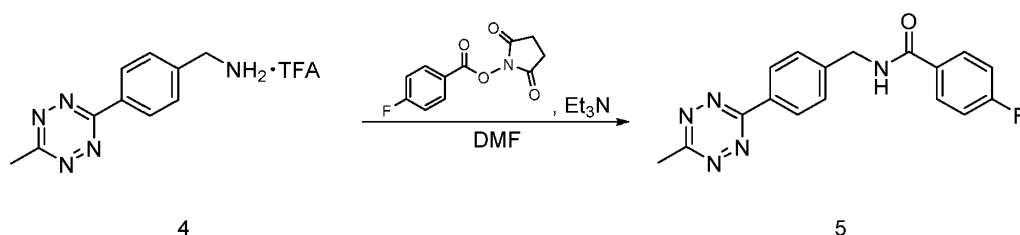
(4-Cianobencil)carbamato de *tert*-butilo (2): hidrocloreuro de 4-(aminometil)benzonitrilo 1 (2,82 g, 16,7 mmol) y trietilamina (4,7 ml, 33,7 mmol) se disolvieron en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (50 ml) a 0°C. A esta disolución agitada se añadió dicarbonato de di-*tert*-butilo (4,38 g, 20,1 mmol), y la reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas. La mezcla de reacción se evaporó a vacío, y el residuo se volvió a disolver en éter dietílico (50 ml), que se lavó sucesivamente con HCl ac. 0,5 M (2  $\times$  25 ml),  $\text{NaHCO}_3$  saturado (2  $\times$  25 ml), y salmuera (25 ml). La capa orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$ , se filtró, y se evaporó a vacío para dar un sólido blanquecino. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (Hexanos/ $\text{EtOAc}$  = 10/1) para dar (4-cianobencil)carbamato de *tert*-butilo 2 (3,69 g, rendimiento 95%) como un sólido incoloro. Se caracterizó además según el procedimiento de la bibliografía (4). Las Figuras 13A-13B muestran los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$ , respectivamente.



(4-(6-Metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)bencil)carbamato de *tert*-butilo (3): Una mezcla agitada de carbamato 2 (1,5 g, 6,46 mmol), MeCN (3,4 ml, 64,6 mmol) y  $\text{NiCl}_2$  anhidro (418 mg, 3,23 mmol) se trató gota a gota con hidrazina (5 ml, 161,5 mmol). La mezcla de reacción de color púrpura se agitó a 60°C durante 24 horas. Posteriormente se añadió cuidadosamente una disolución de  $\text{NaNO}_2$  (8,8 g, 127 mmol) en  $\text{H}_2\text{O}$  (65 ml). Se añadió HCl (disolución 2 N) hasta que cesó el desprendimiento de óxidos nitrosos. La disolución de color rojo oscuro se extrajo con acetato de etilo (3  $\times$  60 ml). El extracto se combinó y se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna (Hexanos/ $\text{EtOAc}$  = 8/1) para producir (4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)bencil)carbamato de *tert*-butilo 3 (1,22 g, rendimiento 63%) como un sólido rojo. Se caracterizó además de acuerdo con la bibliografía (5).



(4-(6-Metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)fenil)metanamina (4): En un recipiente de reacción de 100 ml, se cargó la disolución de tetrazina 3 (301 mg, 1,0 mmol) en DCM (12 ml). Se añadió gota a gota ácido trifluoroacético (12 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Posteriormente, la mezcla se evaporó y se suspendió en Et<sub>2</sub>O (20 ml) para recristalización a -20°C. El sobrenadante se decantó, y el residuo se secó a vacío durante 2 horas para producir (4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)fenil)metanamina 4 (200 mg, rendimiento 99%) como un sólido rojo. El producto se caracterizó además de acuerdo con la bibliografía (6).



4-Fluoro-*N*-(4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)encil)benzamida (5): A una disolución de la sal de TFA de tetrazinamina 4 (50 mg, 0,25 mmol) en DMF anhidro (3,5 ml) se añadió 4-fluorobenzoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (50 mg, 0,223 mmol) y Et<sub>3</sub>N (0,35 ml, 2,5 milimoles). A continuación, la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche bajo gas argón. La mezcla de reacción se paralizó con agua (15 ml), y después se extrajo con éter etílico (10 ml x 3). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (Hexanos/EtOAc=7/1) para producir 4-fluoro-*N*-(4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)encil)benzamida 5 (29 mg, 36%) como un polvo sólido rojo.

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO) δ 9,18 (t, *J* = 6,1 Hz, 1H), 8,43 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,99 (dd, *J* = 5,5, 3,3 Hz, 2H), 7,58 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,31 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H), 4,60 (d, *J* = 6,1 Hz, 2H), 2,97 (s, 3H); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO) δ 167,5, 165,9 (d, *J* = 23,3 Hz), 163,6, 162,8, 144,8, 131,0 (d, *J* = 3,1 Hz), 130,8, 130,3 (d, *J* = 8,9 Hz), 128,5, 127,9, 115,7 (d, *J* = 21,7 Hz), 43,0, 21,3; HRMS calculado para C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>5</sub>O<sup>+</sup> [*M*+*H*]<sup>+</sup>, 324,1261; encontrado 324,1265.

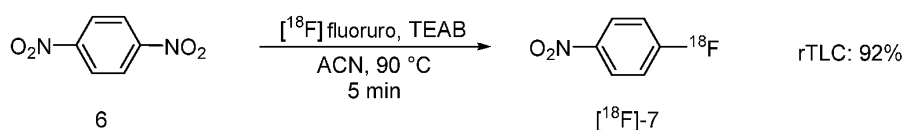
Síntesis radioquímica de [<sup>18</sup>F]-Tetrazina ([<sup>18</sup>F]-5).

Métodos generales para la producción de radioisótopos: se usó un ciclotrón GE PETtrace de 16,5 MeV para la producción de [<sup>18</sup>F]fluoruro por reacción nuclear <sup>18</sup>O(p,n)<sup>18</sup>F para irradiar agua enriquecida con <sup>18</sup>O. El [<sup>18</sup>F]fluoruro se suministró a una celda caliente blindada con plomo en agua enriquecida con <sup>18</sup>O mediante presión de gas nitrógeno.

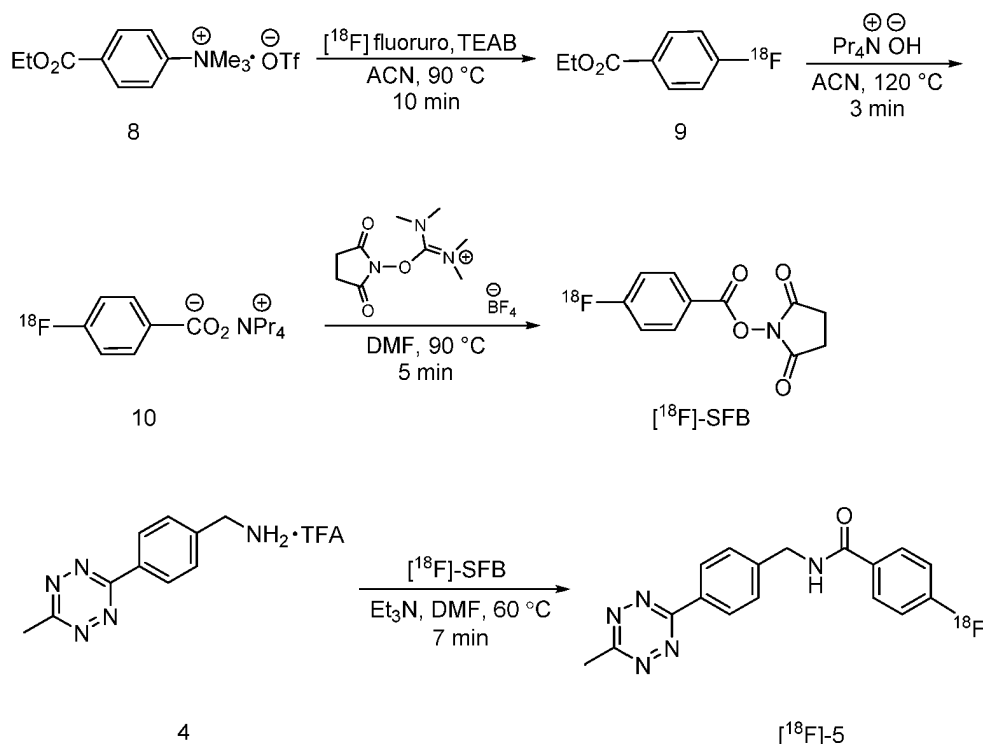
Métodos generales para el análisis de las reacciones de radiofluoración: la radiactividad se cuantificó usando una cámara de iones Capintec Radioisotope Calibrator (CRC-712M). Los rendimientos de incorporación radioquímica se determinaron por radioTLC. Las placas EMD TLC Silica gel 60 (10 x 2 cm) se mancharon con una alícuota (1-5 µl) de mezcla de reacción bruta aproximadamente a 1,5 cm desde el fondo de la placa (línea de base). Las placas de TLC se revelaron en una cámara que contenía acetato de etilo hasta 2 cm de la parte superior de la placa (frente). El análisis se realizó usando un escáner de formación de imágenes por radio-TLC Bioscan AR-2000 y el software WinScan. La identidad radioquímica y la pureza se determinaron por radioHPLC. Se usó una columna de HPLC Phenomenex Luna C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm, con una bomba de HPLC isocrática Waters 1515 equipada con un detector de absorbancia Waters 2487 Dual λ, un Bioscan Flow-Count equipado con un cristal de NaI, y el software Breeze.

Radiomarcage manual.

CONTROL:



## EXPERIMENTO:



[<sup>18</sup>F]fluoruro se preparó para radiofluoración mediante el siguiente método: se añadió una disolución de base (bicarbonato de tetraetilamonio (TEAB), 6 mg) en acetonitrilo y agua (1 ml, v/v 7:3) a una alícuota de agua diana (≤ 1 ml) que contenía la cantidad apropiada de [<sup>18</sup>F]fluoruro en un vial en forma de V sellado con un tabique revestido de teflón. El vial se calentó hasta a 110°C mientras se hacía pasar gas nitrógeno a través de una columna P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Drierite™, seguido de la ventilación del vial. Cuando no se vio líquido en el vial, se retiró del calor, se añadió acetonitrilo anhidro (1 ml), y se reanudó el calentamiento hasta sequedad. Esta etapa se repitió tres veces más. A continuación, el vial se enfrió a temperatura ambiente bajo presión de nitrógeno. Los contenidos se resolubilizaron en CH<sub>3</sub>CN (0,6 ml). Se añadió una disolución de TEA[<sup>18</sup>F] (0,2 ml) en otro vial en forma de V cargado con 1,4-dinitrobenzono 6 (2 mg) y CH<sub>3</sub>CN (0,2 ml). La mezcla se calentó a 90°C durante 5 min, y después se inactivó con fase móvil de HPLC (40% CH<sub>3</sub>CN, 60% NH<sub>4</sub>·HCO<sub>2</sub>(ac.) 0,1 M, 0,2 ml). La placa de TLC se manchó con mezcla bruta (2 μl), y se reveló con EtOAc al 100% para determinar la conversión radioquímica. El valor de RCC (92%) reveló que la disolución de TEA[<sup>18</sup>F] estaba lista para el radiomarcaje. (tiempo total: 8 minutos)

Nota: La calidad de TEA[<sup>18</sup>F] es crucial para el siguiente radiomarcaje, por lo que el control es necesario para evaluar la calidad.

Se añadió 4-(triflato de trimetilamonio)benzoato de etilo 8 (4,8 mg) en MeCN anhidro (0,6 ml) a la disolución de [<sup>18</sup>F]TEA seca anterior (0,4 ml), y la mezcla se calentó a 90°C durante 10 min para producir 4-[<sup>18</sup>F]fluorobenzoato de etilo 9. Posteriormente, el éster etílico se hidrolizó para formar 10 usando hidróxido de tetrapropilamonio (20 μl, 1,0 M en agua) a 120°C durante 3 min, y después la mezcla se secó azeotrópicamente usando MeCN (1 ml). Posteriormente, se añadió una disolución de tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(N-succinimidil)uronio (10 mg) en DMF (0,3 ml), y la disolución se calentó a 90°C durante 5 min. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió una disolución de sal de TFA de tetrazinamina 4 (1,7 mg) en DMF (0,3 ml) a la mezcla, seguido de la adición de Et<sub>3</sub>N (20 μl). Después, la reacción se calentó a 60°C durante 7 min, se paralizó con fase móvil de HPLC (60% CH<sub>3</sub>CN, 40% NH<sub>4</sub>·HCO<sub>2</sub>(ac.) 0,1 M, 2 ml). La disolución se diluyó con agua (15 ml), se hizo pasar a través de un cartucho C18, se lavó con agua (10 ml), y se eluyó con acetonitrilo (1,5 ml) para determinar el rendimiento radioquímico (RCY) y la identidad mediante coinyección con [<sup>19</sup>F]-5 estándar. La Figura 8 muestra una tabla de rendimiento radioquímico (sin corrección por descomposición) y un cromatograma de radioHPLC. La columna era luna 5u C18 100 Å 250 x 4,6 mm, la fase móvil fue 60% CH<sub>3</sub>CN, 40% NH<sub>4</sub>·HCO<sub>2</sub>(aq) 0,1 M, y el caudal fue 1 ml/min.

Síntesis automatizada mediante el método GE TracerLab FX<sub>FN</sub>.

Tras la finalización del bombardeo, el [<sup>18</sup>F]fluoruro se transfirió al módulo de radiosíntesis GE TRACERlab™ FX<sub>FN</sub> mediante sobrepresión de gas helio. En la Figura 9 se muestra un diagrama esquemático del módulo de radiosíntesis TRACERlab™ FX<sub>FN</sub> comercial de GE Medical Systems usado para la síntesis de [<sup>18</sup>F]-5.

La síntesis automatizada implica lo siguiente: (1) secado azeotrópico de [<sup>18</sup>F]fluoruro; (2) [<sup>18</sup>F]fluoración; y (3) purificación por HPLC, seguido de formulación en fase sólida del producto final. El módulo de síntesis fue operado en las siguientes secuencias con referencias numéricas a la Figura 9.

- [ $^{18}\text{F}$ ]Fluoruro se produjo mediante la reacción nuclear  $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$  usando un ciclotrón GE y suministrado al módulo de radiosíntesis vía 10. El [ $^{18}\text{F}$ ]fluoruro se atrapó cuantitativamente en un cartucho ligero de extracción en fase sólida (SPE) de intercambio iónico de carbonato QMA (Waters; activado con 6 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  de grado de trazas).
- 5 • La síntesis automatizada comenzó con la elución de [ $^{18}\text{F}$ ]fluoruro usando una disolución de bicarbonato de tetraetilamonio (6 mg en 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{CH}_3\text{CN}$ ), precargado en 1 y suministrado al reactor (12).
- La mezcla de reacción (12) se secó azeotrópicamente a  $85^\circ\text{C}$  bajo flujo de  $\text{N}_2$  y vacío durante 5 min, después a  $110^\circ\text{C}$  bajo flujo de  $\text{N}_2$  y vacío durante 2 min, después se enfrió hasta  $90^\circ\text{C}$ .
- 10 • El 4-(triflato de trimetilamonio)benzoato de etilo 8 (5 mg en 1,0 ml de  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) precargado en 3 se añadió a 12. El reactor se selló mediante el cierre de las válvulas V13, V20 y V24, y la mezcla de reacción se mantuvo a  $90^\circ\text{C}$  durante 10 min.
- La mezcla de reacción se enfrió entonces hasta  $40^\circ\text{C}$ , se ventiló a través de la válvula V24, y se añadió hidróxido de tetrapropilamonio (1,0 M en agua, 20  $\mu\text{l}$  en 0,5 ml de  $\text{CH}_3\text{CN}$ ), precargado en 4, a 12. El reactor se selló mediante el cierre de la válvula V24, y la mezcla de reacción se calentó hasta  $120^\circ\text{C}$ , y esta temperatura se mantuvo durante 3 min, después se enfrió hasta  $70^\circ\text{C}$ .
- 15 • La mezcla de reacción (12) se secó azeotrópicamente mediante la adición de 1 ml de  $\text{CH}_3\text{CN}$  anhidro, precargado en 5, a  $70^\circ\text{C}$  bajo flujo de  $\text{N}_2$  y vacío durante 6 min.
- Se añadió tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(N-succinimidil)uronio (TSTU, 10 mg) en DMF (0,5 ml), precargado en 6, a 12. El reactor se selló a través del cierre de la válvula V24, y la mezcla de reacción se calentó hasta  $90^\circ\text{C}$ , y esta temperatura se mantuvo durante 5 min, después se enfrió hasta  $60^\circ\text{C}$ .
- 20 • Una mezcla de sal de TFA de tetrazinamina 4 (6,0 mg) y  $\text{Et}_3\text{N}$  (40  $\mu\text{l}$ ) en DMF (0,5 ml), precargada en 2, se añadió a 12. La mezcla de reacción se mantuvo a  $60^\circ\text{C}$  durante 7 min.
- La mezcla de reacción bruta se eluyó en 14, que se precargó con 20:80  $\text{CH}_3\text{CN}$ /disolución de formiato de amonio 0,1 M (3 ml). Los contenidos de 14 se transfirieron al bucle de HPLC a través de presión de  $\text{N}_2$  usando un detector de fluido, se inyectaron en una columna semipreparativa (Luna C18 semipreparativa, 250 x 10,00 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), y se eluyeron con 40:60  $\text{CH}_3\text{CN}$ /formiato de amonio 0,1 M en volumen a un caudal de 5 ml/min. El eluyente se monitorizó mediante UV ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) y detectores radioquímicos conectados en serie.
- 25 • En la Figura 10 se muestra un cromatograma de HPLC semipreparativa típico. La fracción que contenía el producto radioquímico mayoritario ( $t_R = 20,1 \text{ min}$ ) se recogió, a través de la válvula 18, en un recipiente de dilución grande (15), que se precargó con 23 ml de agua estéril para inyección (Farmacopea de los Estados Unidos (USP); Hospira).
- 30 • La fracción de HPLC diluida se cargó entonces en un cartucho C18 SPE (16) (Waters; preactivado con 5 ml de  $\text{EtOH}$ , seguido de 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ ).
- El cartucho 16 se lavó con 10 ml de agua estéril para inyección, USP, precargada en 7, para eliminar las trazas de sales, la fase móvil de HPLC, y el [ $^{18}\text{F}$ ]fluoruro. Después, 16 se eluyó con 1,5 ml de  $\text{CH}_3\text{CN}$ , precargado en 8, en el vial de recolección 17.
- 35

Los análisis de las mezclas radiactivas se realizaron mediante HPLC con un detector UV en línea ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) en serie con un detector de radiactividad de diodo CsI PIN. Los rendimientos radioquímicos no corregidos de [ $^{18}\text{F}$ ]-5 fueron  $10 \pm 3\%$  ( $n = 8$ ) con respecto al [ $^{18}\text{F}$ ]fluoruro de partida.

Síntesis y caracterización de los [ $^{18}\text{F}$ ]-VHH.

- 40 Procedimiento general: la disolución de [ $^{18}\text{F}$ ]-tetrazina 5 obtenida de  $\text{FX}_{\text{FN}}$  se concentró a  $70^\circ\text{C}$  bajo flujo de  $\text{N}_2$  durante 10 min, después se enfrió hasta temperatura ambiente. Se cargó un tubo de centrífuga (1,5 ml) con PBS (150  $\mu\text{l}$ ) y una disolución de [ $^{18}\text{F}$ ]-tetrazina 5 en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (50  $\mu\text{l}$ ), después se midió la radiactividad con un calibrador de dosis (10-15 mCi). Se añadió VHH-TCO (monómero o dímero) en PBS (100  $\mu\text{l}$ ) al tubo de centrífuga en la última etapa. Se permitió que la reacción prosiguiera con agitación constante a temperatura ambiente durante -20 min. La mezcla se
- 45 analizó por radio-TLC (100%  $\text{EtOAc}$ ,  $R_f$ [ $^{18}\text{F}$ ]-Tz 5 = 0,6,  $R_f$ [ $^{18}\text{F}$ ]-VHHs = 0,0), mostrando más del 80% de conversión radioquímica. La mezcla de reacción se cargó en un cartucho de exclusión por tamaño PD-10 (GE Healthcare), y se usó PBS (2 x 500  $\mu\text{l}$ ) para ayudar en la transferencia. Posteriormente, se midió la actividad del tubo de centrífuga de reacción con el calibrador de dosis ( $< 50 \mu\text{Ci}$ ), confirmando una transferencia completa. El cartucho PD-10 se eluyó con PBS (10 x 500  $\mu\text{l}$ ), y cada fragmento se recogió en un tubo nuevo de 1,5 ml. El producto deseado, los [ $^{18}\text{F}$ ]-VHH, normalmente eluyó en los tubos #4-7. Caracterización (usando dímero de [ $^{18}\text{F}$ ]-DC8 como ejemplo): cromatografía
- 50 rTLC (Figura 11 (panel izquierdo) [ $^{18}\text{F}$ ]-Tz 5; Figura 11 (derecha) dímero de [ $^{18}\text{F}$ ]-DC8; a los 20 minutos). La recogida de fragmentos a través del cartucho PD-10 se puede encontrar en Figura 12. Después de la cromatografía de exclusión por tamaño, se obtuvo un rendimiento radioquímico del  $47 \pm 9\%$  ( $n = 5$ , sin corrección por descomposición).

# Estudios de formación de imagen MicroPET.

Todos los procedimientos y protocolos de animales fueron aprobados por el subcomité de cuidado de animales de investigación del Hospital General de Massachusetts. Se inyectaron [<sup>18</sup>F]VHH (20-40 µCi) en la vena de la cola de cada animal. Se tomaron imágenes de los ratones en serie usando un microPET (Sofie, G4-PET). Para todos los experimentos de imágenes, los ratones se anestesiaron usando isoflurano al 2% en O<sub>2</sub> a un caudal de ~1,5 l/min, colocados en una posición boca abajo a lo largo del eje largo del escáner Micronet, y se fotografiaron. Las imágenes se reconstruyeron usando un algoritmo de reconstrucción de retroproyección filtrada. Para el análisis de imágenes, las regiones cilíndricas de interés (ROI) se dibujaron manualmente a partir de imágenes de PET reconstruidas con retroproyección filtrada tridimensional (FBP) usando el software AMIDE. La radiactividad regional se expresó como el porcentaje del valor de absorción estandarizado [% SUV = % ID/ml x peso corporal (g)]. Se produjeron visualizaciones bi- y tridimensionales usando el visor DICOM OsiriX (© Pixmeo SARL, 2003-2014).

## Secuencias de DC8 y DC13

### DC8:

#### Ácido nucleico:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCAGGGGGAGGATTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAG  
ACTCTCCTGTACAGCCTCTGGATTACATTACAGTACTTACTACATGAGCTGGGTCCGC  
AAGGCTCCAGGGAAGGGGCCGAGTGGGTCTCAGTTATGAATAGTAGTGGTGGTGA  
CACAAGGTATGCAGACTTCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCA  
AGAACACACTGTATCTCCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGATACGGCCCTGTATT  
ACTGTGCGCAAGGTAGATCAGATATATACCCAACCTTCACGCGGGGCCAGGGGACC  
CAGGTCACCGTCTCCTCAGGAGGACTGCCGGAACCGGC (SEQ ID NO: 1)

#### Péptido:

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSTYYMSWVRKAPGKGPEWVSVMNSSGGD  
TRYADFKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTALYYCAQGRSDIYPTFTRGQGTQVT  
VSSGSLPETGGHHHHHH (SEQ ID NO: 2)

### DC13:

#### Ácido nucleico:

CAGGTTCAACTGCAAGAGAGTGGCGGGGGCCTGGTTCAGACCGGTGGTTCTCTCCG  
GCTCTCGTGTGCCGCAAGTGGAGTAGATTTTAACTGGTATAGCATGGGTGGTTCAG  
GCAAGCCCCTGGCAAAGAGCGGGAGTATGTGGCTTCGATTGACCAGGGAGGCGAGT  
TGGATTACGCAATATCAGTAAAGGGCAGATTCACGATCTCCCGAGACAACGCGAAG  
AATATGGTGTATCTCCAGATGAATTCGTAAAGCCCGAAGACACCGCTGTATACTAC  
TGTGCCGCAGATTTTCCGGCCGGGGTGCGTCAAACCCTGACAAGTATAAATATTGG  
GGACAGGGAACCCAAGTGACCGTCAGCAGCGGTGGGTTGCCCGAAACTGGAGGAC  
ACCATCACCATCACCAT (SEQ ID NO: 3)

#### Péptido:

QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCAASGVDFNWYSMGWFR  
QAPGKEREYVASIDQGGELDYAISVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCA  
ADFSGRGASNPDKYKYWGQGTQVTVSSGGLPETGGHHHHHH (SEQ ID NO: 4)

## Referencias

1. Chen I, Dorr BM, Liu DR (2011) A general strategy for the evolution of bond-forming enzymes using yeast display. Proc Natl Acad Sci U S A 108(28): 11399-11404.

2. Theile CS, et al. (2013) Site-specific N-terminal labeling of proteins using sortase-mediated reactions. *Nat Protoc* 8(9): 1800-1807.
3. Witte MD, et al. (2012) Preparation of unnatural N-to-N and C-to-C protein fusions. *Proc Natl Acad Sci* 109(30): 11993-11998.
- 5 4. Mok NY, Chadwick J, Kellett KAB, Casas-Arce E, Hooper NM, Johnson AP, Fishwick CWG (2013) Discovery of biphenylacetamide-derived inhibitors of BACE1 using de novo structure-based molecular design. *J Med Chem* 56(5):1843-1852.
5. Yang J, Karver MR, Li W, Sahu S, Devaraj NK (2012) Metal-catalyzed one-pot synthesis of tetrazines directly from aliphatic nitriles and hydrazine. *Angew Chem Int Ed* 51(21): 5222-5225.
- 10 6. Evans HL, Carroll L, Aboagye EO, Spivey AC (2014) Bioorthogonal chemistry for <sup>68</sup>Ga radiolabelling of DOTA-containing compounds. *J Label Compd Radiopharm* 57(4):291-297.

### Ejemplo 3. Inmuno-PET de células tumorales *in vivo*.

La inmunoterapia con anticuerpos bloqueadores de puntos de control contra dianas tales como CTLA4 y PD-1 se puede usar para tratar el melanoma y el cáncer de pulmón no microcítico en un subconjunto de pacientes. La presencia de células T en un tumor se correlaciona con una mejor supervivencia. Se mostró que la tomografía por emisión de positrones (inmunoPET) visualiza tumores mediante la detección de linfocitos infiltrantes, que se pueden usar para distinguir sujetos que responden a los inhibidores de puntos de control de sujetos que no responden o responden de manera deficiente a los inhibidores de puntos de control. Fragmentos de anticuerpos de dominio único PEGilados (VHH) marcados con <sup>89</sup>Zr, específicos para el marcador de células T MHC II, se usaron para rastrear la presencia de células T intratumorales mediante inmunoPET. En las Figuras 15A y 15B se muestran métodos y composiciones ejemplares para generar dichos marcadores. Tales fragmentos de anticuerpos de dominio único PEGilados marcados con <sup>89</sup>Zr pueden usarse para detectar/evaluar los linfocitos que se infiltran en el tumor, por ejemplo en respuesta al bloqueo del punto de control en un sujeto (por ejemplo, un paciente), o un modelo biológico de progresión del tumor (por ejemplo, un modelo de melanoma B16). El VHH anti-MHC II, PEGilado, marcado con <sup>89</sup>Zr (VHH7), detectó timo y estructuras linfoides secundarias, así como células T positivas para MHC II intratumorales (Figuras 16A y 16B). A ratones B6 de tipo salvaje se les inyectaron 0,5 millones de células de melanoma B16 (Figura 16A), y se les inyectó VHH anti-MHC II PEGilado, marcado con <sup>89</sup>Zr, 7 días después de la inyección de las células de melanoma. El PEG tenía un tamaño de 20 kDa. Las imágenes de PET se adquirieron 24 horas después de la inyección con el VHH anti-MHC II PEGilado marcado con <sup>89</sup>Zr. La notación que se muestra en la figura 16A se refiere a lo siguiente: C-LN: ganglios linfáticos cervicales; Ax: axilar, Br: braquial; KD: riñones; SP: bazo; MB: médula ósea. Como control, a los ratones B6 de tipo salvaje a los que no se les inyectaron células B6 se les inyectó VHH anti-MHC II PEGilado marcado con <sup>89</sup>Zr (Figura 16B). El PEG tenía un tamaño de 20 kDa. Las imágenes de PET se adquirieron 24 horas después de la inyección con el VHH anti-MHC II PEGilado marcado con <sup>89</sup>Zr. La notación que se muestra en la figura 16B se refiere a lo siguiente: C-LN: ganglios linfáticos cervicales; Ax: axilar, Br: braquial; KD: riñones; SP: bazo; MB: médula ósea. El <sup>89</sup>Zr-PEGilado-VHH7 fue capaz de detectar las células tumorales B6 en el ratón detectando linfocitos que se infiltran en el tumor (Figura 16A).

Las respuestas inmunitarias se producen en estructuras linfoides organizadas, en las que las células presentadoras de antígeno profesionales interactúan con los linfocitos T y B para protegerse de enfermedades infecciosas o cáncer. Además de depender de la supervivencia, las respuestas inmunitarias -ya sean dañinas o protectoras- se evalúan comúnmente tomando muestras de sangre y midiendo los niveles de linfocitos circulantes y sus productos, tales como citocinas e inmunoglobulinas. En seres humanos, el acceso a la médula ósea, el bazo y los ganglios linfáticos requiere intervenciones quirúrgicas tales como biopsias o toma de muestras en autopsias, métodos difíciles de aplicar a gran escala. Se aplican limitaciones similares a la toma de muestras de órganos linfoides en animales vivos, pero al menos los modelos animales ofrecen la posibilidad de eutanasia y examen en la necropsia de cualquier órgano o tejido de interés. La mayor parte de la inmunología del ratón se basa en métodos que no proporcionan información longitudinal para animales individuales. Por lo tanto, la evaluación de las respuestas inmunitarias a lo largo del tiempo sigue siendo un desafío. La microscopía multifotónica intravital puede mostrar la migración de células T, B y otros inmunocitos en tiempo real, y ha aclarado nuestra comprensión de, por ejemplo, la reacción del centro germinal. No obstante, tal cartografiado del movimiento de diversos linfocitos y otros subconjuntos de células requiere procedimientos invasivos complicados. El seguimiento de una respuesta inmune celular en un animal vivo a lo largo del tiempo sigue siendo un desafío sin resolver.

El campo de la inmunología tumoral ha progresado mucho, en particular en las áreas de anticuerpos usados como bloqueo de puntos de control y para terapias basadas en células, tales como células T que expresan receptores de antígenos quiméricos (células CAR-T). Para ciertos cáncer (melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, leucemia linfoblástica aguda), la inmunoterapia ha revolucionado el tratamiento clínico, e incluso ha producido curas, pero la falta de respuesta de una fracción significativa de pacientes -incluso en estos tipos de cáncer tratables- sigue siendo un problema. Por lo tanto, sería muy deseable seguir y visualizar las respuestas inmunitarias longitudinalmente para el pronóstico.

5 Si fuera posible estratificar a los pacientes en aquellos que podrían beneficiarse de ciertas formas de inmunoterapia y separarlos de los que tienen menos probabilidades de hacerlo, los tratamientos costosos con efectos secundarios potencialmente graves podrían asignarse a aquellos individuos con una alta probabilidad de respuesta. La tomografía por emisión de positrones (PET) que usa anticuerpos o fragmentos de anticuerpos marcados (inmuno-PET) puede lograr este objetivo.

10 Para lograr el objetivo de monitorizar de manera no invasiva la distribución de las células T, se usó un formato derivado de un anticuerpo de peso molecular pequeño que retiene la capacidad de unión al antígeno, el segmento de región variable de los anticuerpos solamente de cadena pesada de camélidos, también conocidos como VHH o nanocuerpos. Estos fragmentos suelen tener un tamaño de aproximadamente 14 kDa, y se prestan fácilmente a transformaciones enzimáticas catalizadas por sortasa para una variedad de fines, incluyendo la instalación de radioisótopos para formación de imágenes mediante PET.

# REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión radiomarcada, que comprende:
  - (i) un anticuerpo o un fragmento del mismo,
  - (ii) un polímero hidrófilo de un peso molecular de 5-40 kDa,
  - 5 (iii) un radionucleido; y
  - (iv) un resto quelante;en la que el radionucleido se une al resto quelante;
- en la que el polímero hidrófilo y el resto quelante están conjugados cada uno con el anticuerpo o fragmento del mismo;
- 10 en la que el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo intacto, un anticuerpo de dominio único, un anticuerpo de dominio único VHH, un fragmento Fv monocatenario (scFv), Fab, o un diacuerpo; y
- en la que el anticuerpo o fragmento del mismo se une a una célula tumoral, una célula asociada a un tumor, o un antígeno tumoral; o el anticuerpo o fragmento del mismo se une a una célula inmune.
2. La proteína de unión radiomarcada de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo o fragmento del mismo tiene un
- 15 tamaño de 10 kDa a 40 kDa.
3. La proteína de unión radiomarcada de la reivindicación 1 o 2, en la que el polímero hidrófilo se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP), alcohol polivinílico (PVA), ácido poliacrílico (PAA), poliacrilamida, N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMA), divinil éter-anhídrido maleico (DIVEMA), polioxazolina, polifosfoéster (PPE), polietilenimina (PEI), y polifosfaceno, preferiblemente en la que el polímero hidrófilo es un
- 20 polietilenglicol (PEG).
4. La proteína de unión radiomarcada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el peso molecular del polímero hidrófilo es aproximadamente 20 kDa.
5. La proteína de unión radiomarcada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el radionucleido es rubidio-82, cobre-61, cobre-62, cobre-64, itrio-86, galio-68, o zirconio-89.
- 25 6. La proteína de unión radiomarcada de la reivindicación 5, en la que el radionúclido es zirconio-89.
7. La proteína de unión radiomarcada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el resto quelante es ácido 1,4,7-triazaciclono-nano-triacético (NOTA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-tetraacético (DOTA), triazaciclono-nano-fosfinato (TRAP), o desferrioxamina (DFO).
8. La proteína de unión radiomarcada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el radionucleido es
- 30 cobre-61.
9. La proteína de unión radiomarcada de la reivindicación 6, en la que el zirconio-89 está unido por un resto quelante de desferrioxamina (DFO).
10. Una composición que comprende la proteína de unión radiomarcada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y un excipiente.
- 35 11. Una proteína de unión radiomarcada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o 15, o una composición según la reivindicación 10, para uso como medicamento, preferiblemente como diagnóstico.
12. Una proteína de unión radiomarcada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o 15, o una composición según la reivindicación 10, para uso en el diagnóstico, monitorización, formación de imágenes, o tratamiento de un sujeto, que comprende: (a) administrar la proteína de unión radiomarcada de una cualquiera de las reivindicaciones 1
- 40 a 9 o 15, o la composición según la reivindicación 10; y (b) detectar el radiomarcador en el sujeto.
13. Una proteína de unión radiomarcada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o 15, o una composición según la reivindicación 10, para uso en la obtención de una imagen radiológica de un sujeto, que comprende:
  - (i) administrar la proteína de unión radiomarcada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o 15; y
  - (ii) obtener la imagen radiológica del sujeto mediante la captura de la radiación emitida.
- 45 14. Una proteína de unión radiomarcada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o 15, o una composición según la reivindicación 10, para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un tumor, que comprende:

(i) administrar al sujeto la proteína de unión radiomarcada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o 15, o una composición según la reivindicación 10;

(ii) obtener una imagen radiológica del tumor;

(iii) determinar una intensidad o un patrón de la imagen radiológica;

5 (iv) administrar al sujeto un agente destinado a potenciar o inhibir una respuesta inmunitaria basándose en la intensidad o el patrón de la imagen radiológica determinada en la etapa (iii).

15. La proteína de unión radiomarcada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una secuencia de reconocimiento de sortasa, preferiblemente en la que la secuencia de reconocimiento de sortasa es una secuencia de reconocimiento de sortasa C-terminal.

10

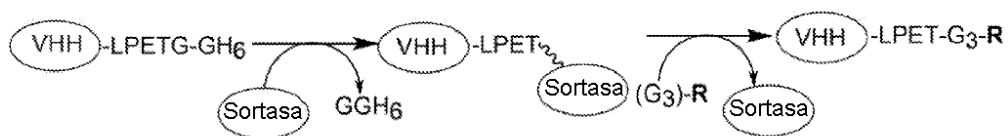


Figura 1A

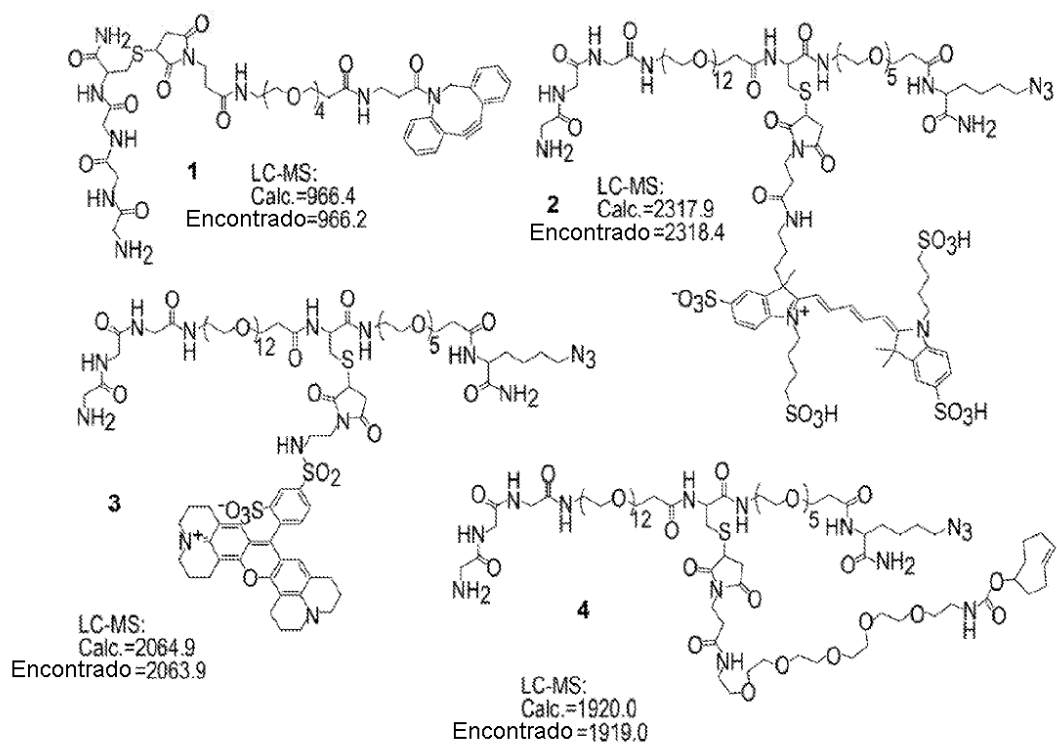


Figura 1B

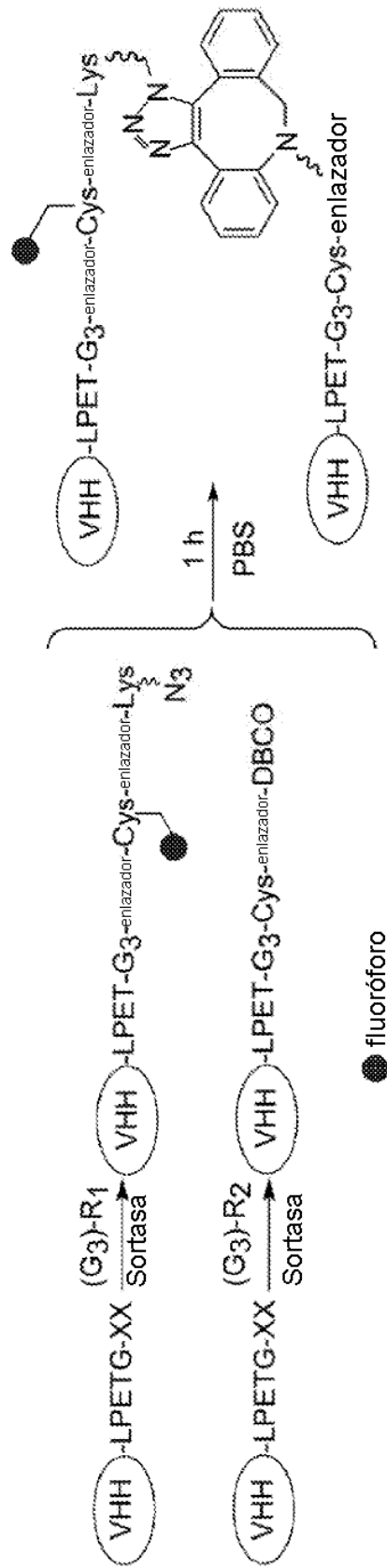


Figura 2A

Figura 2B

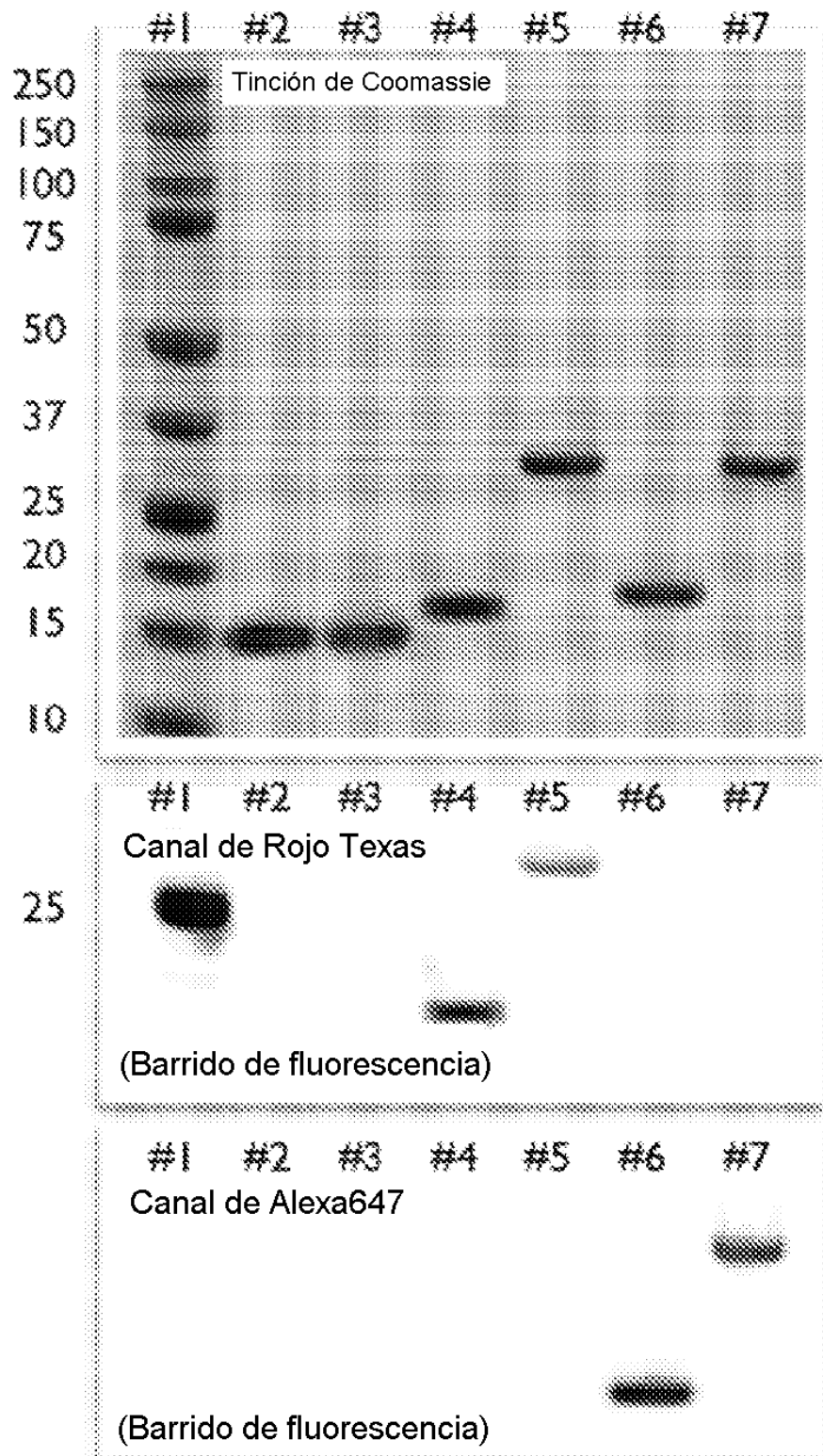


Figura 2C

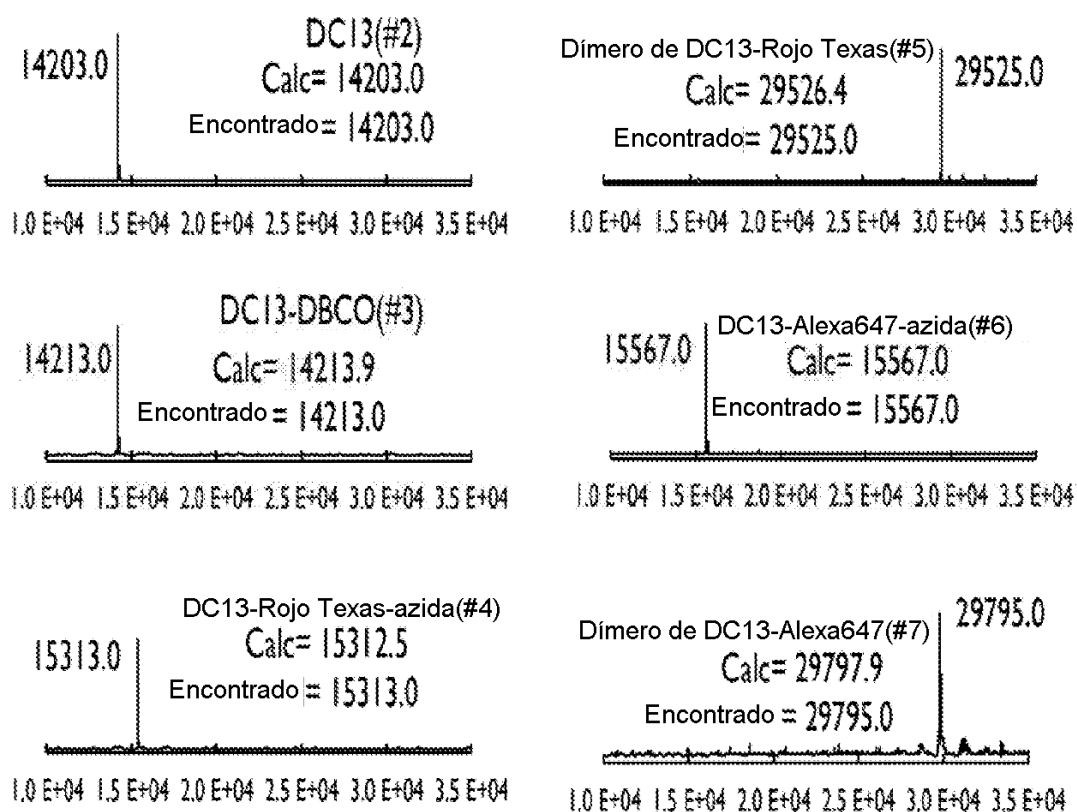


Figura 2D

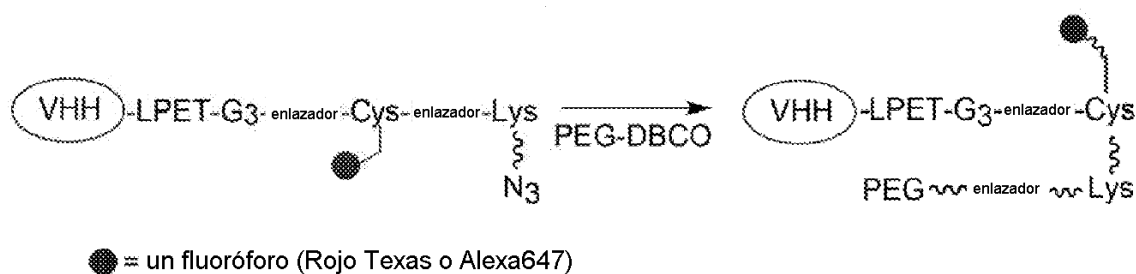


Figura 2D

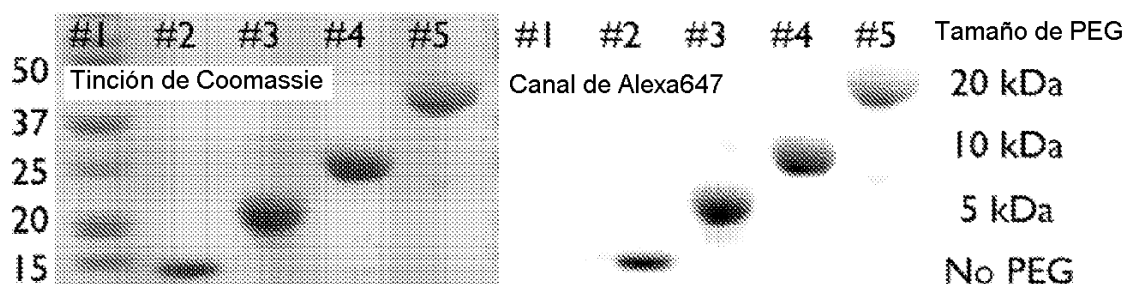


Figura 2F

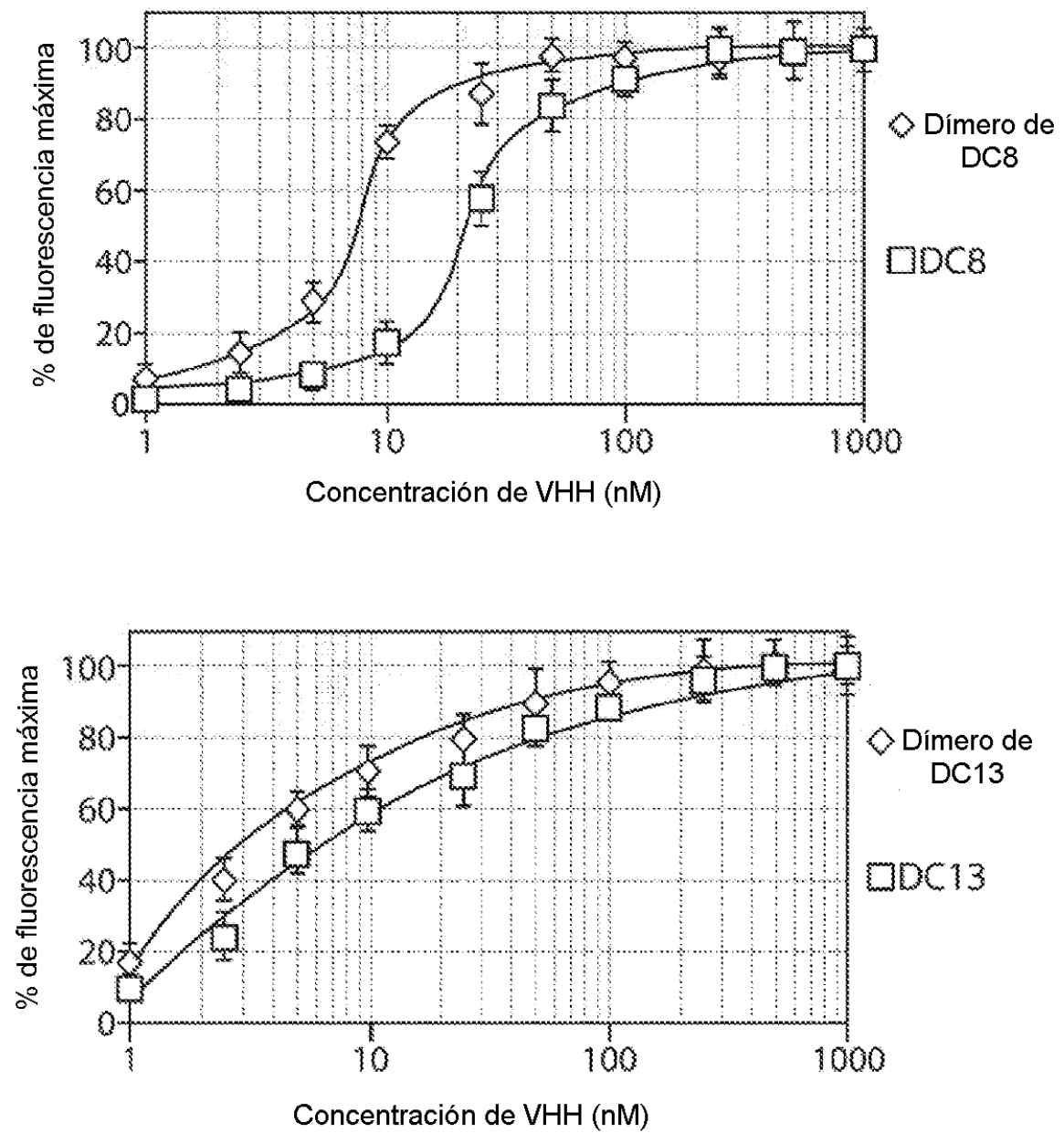


Figura 3A

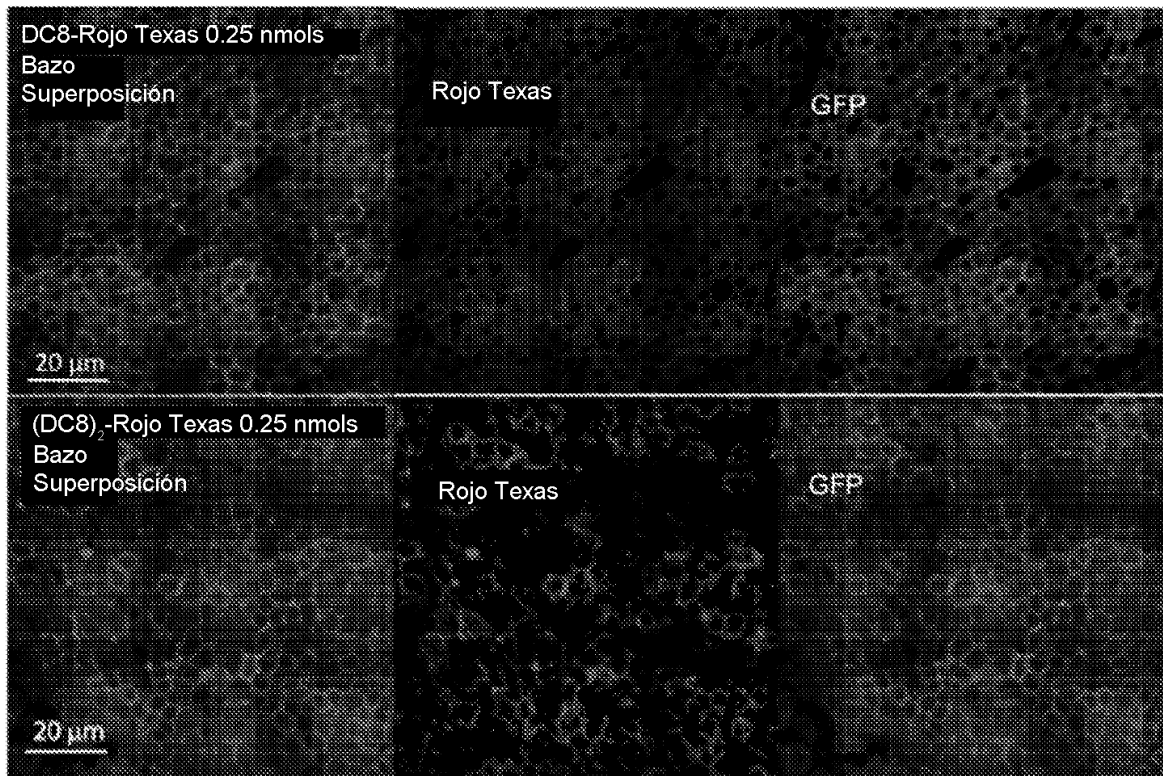


Figura 3B

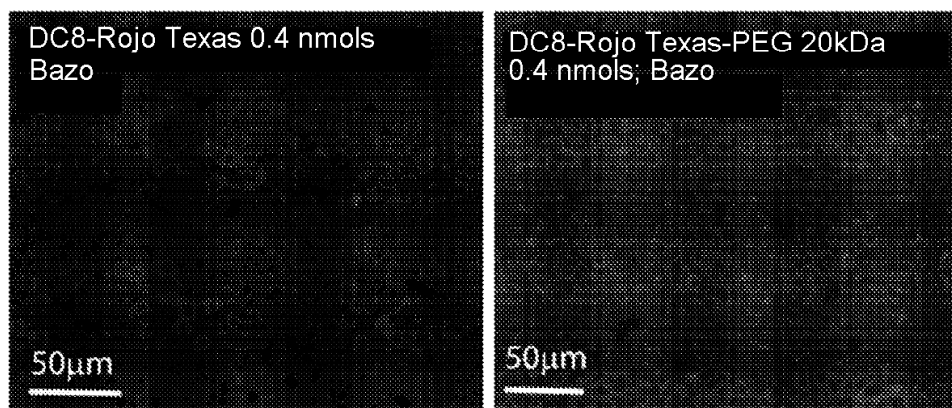


Figura 3C

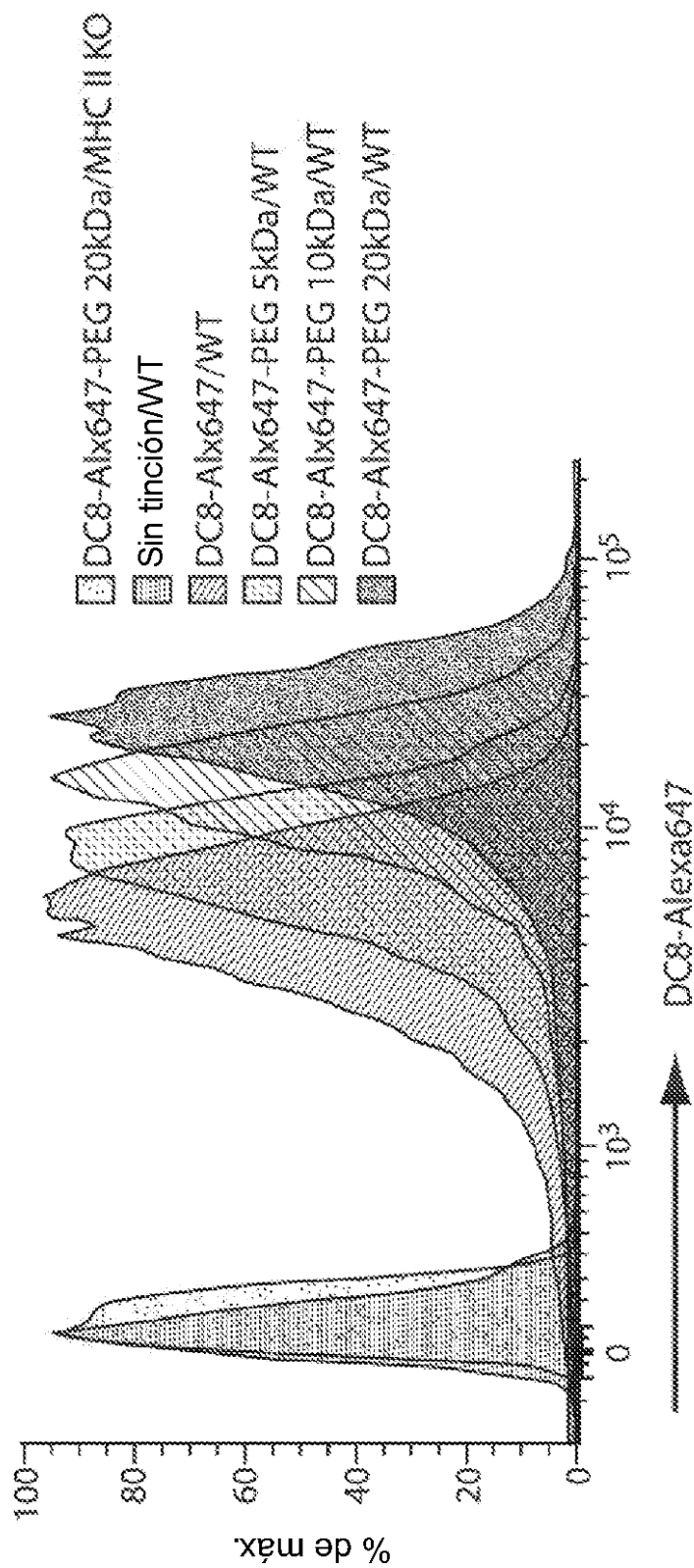


Figura 3D

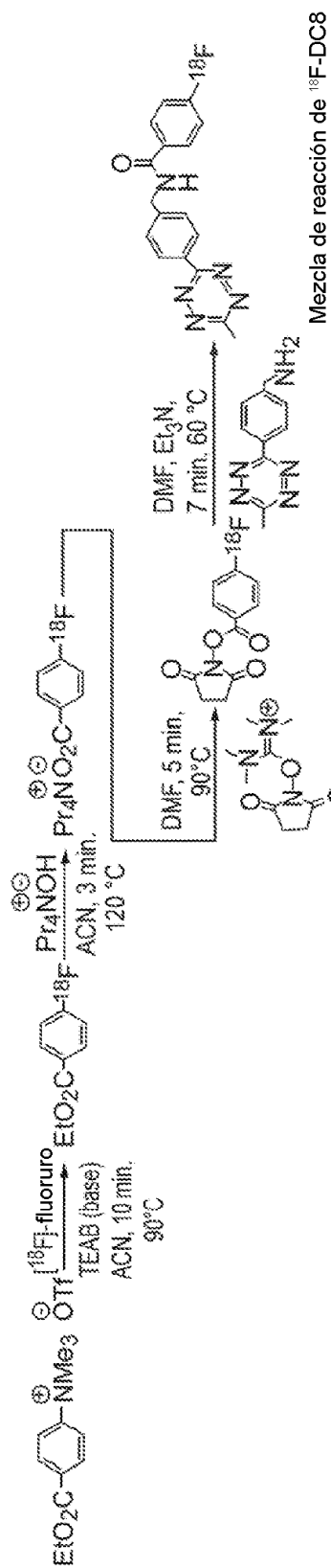
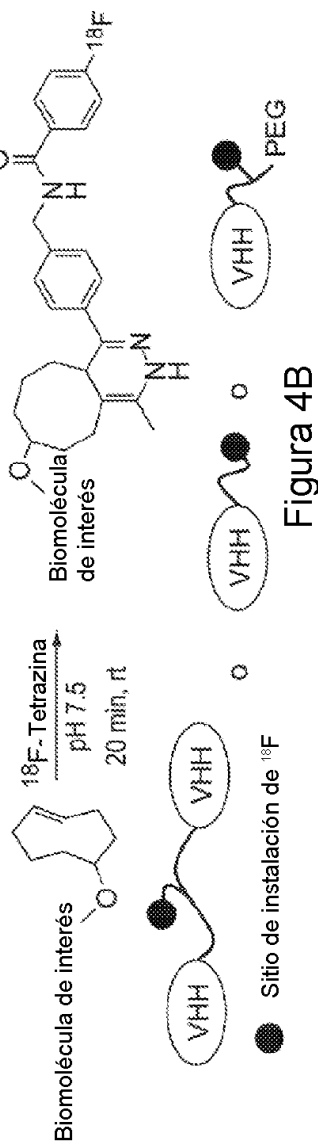


Figura 4A



## Figura 4B

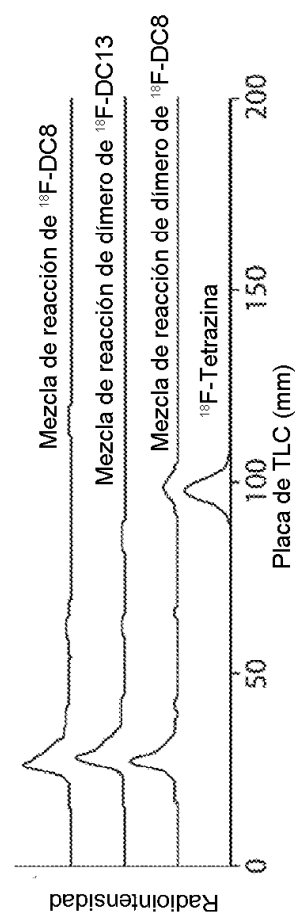


Figura 4C

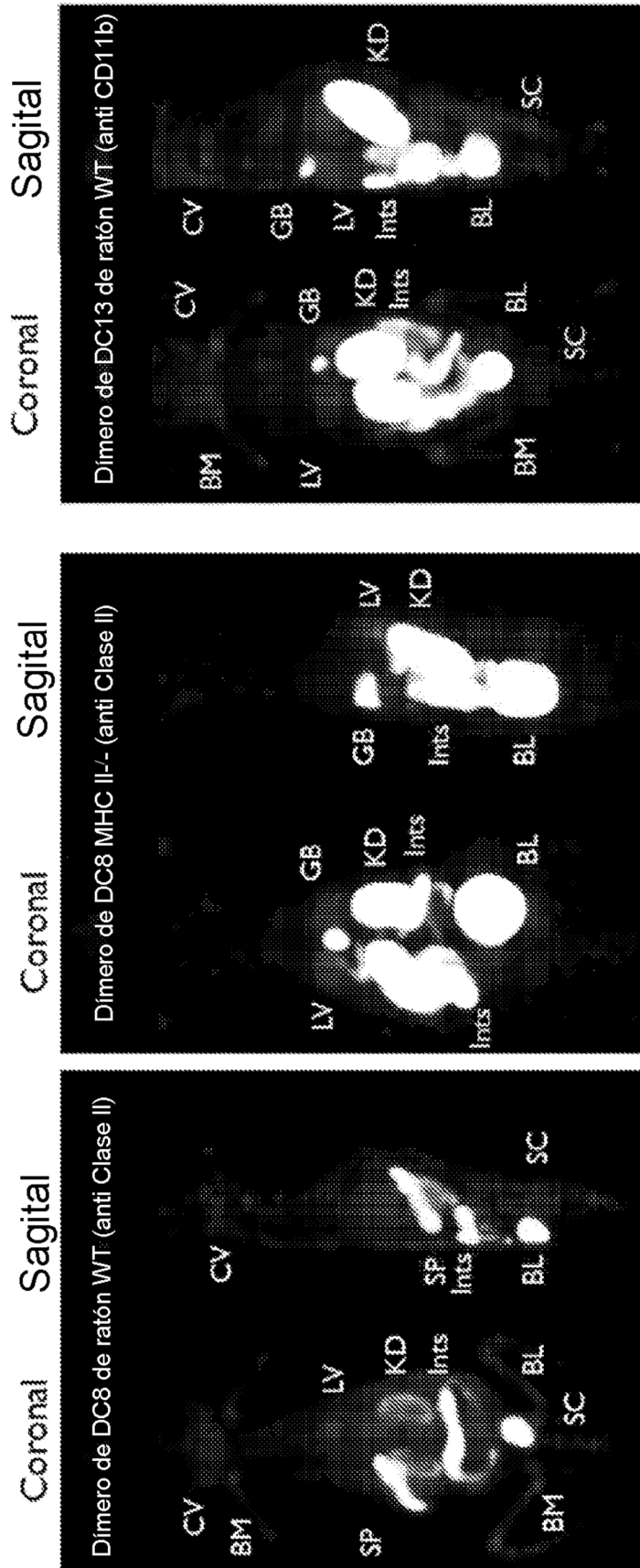


Figura 4D

Figura 4E

Figura 4F

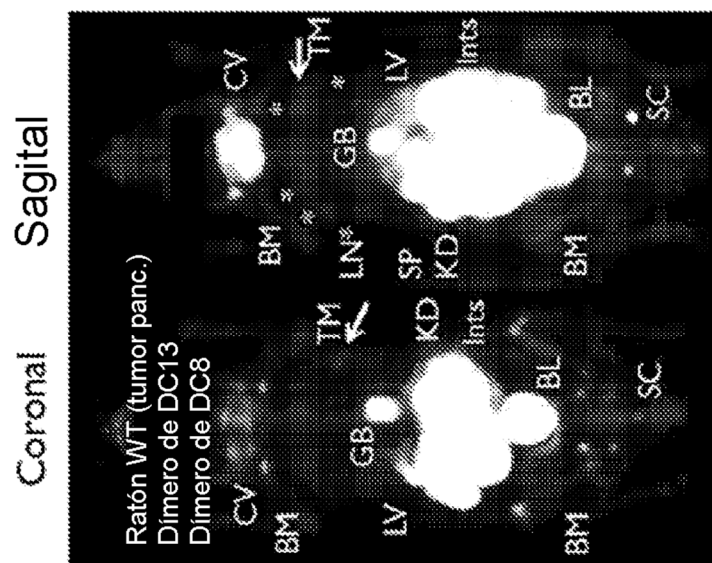


Figura 4I

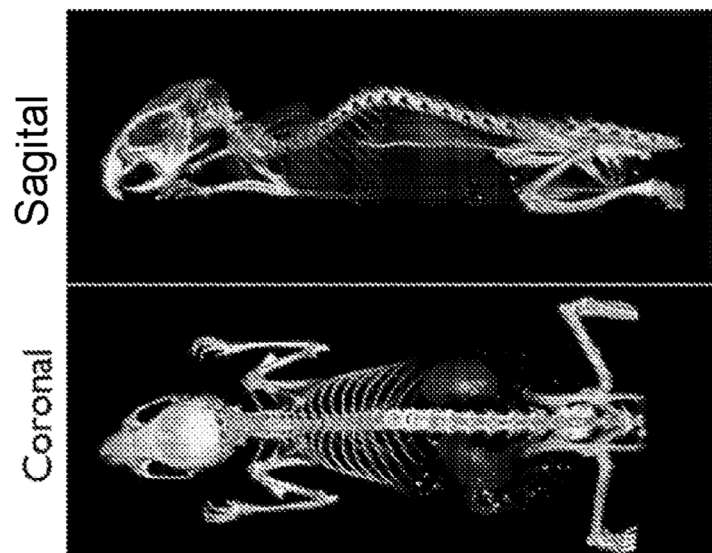


Figura 4H

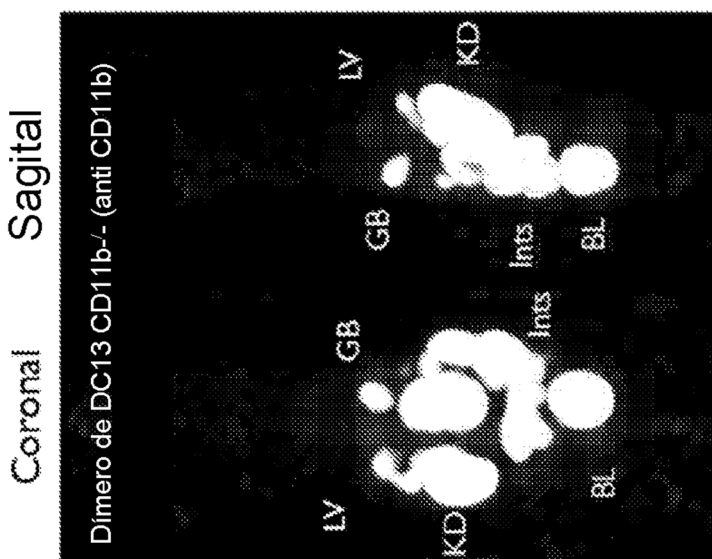


Figura 4G

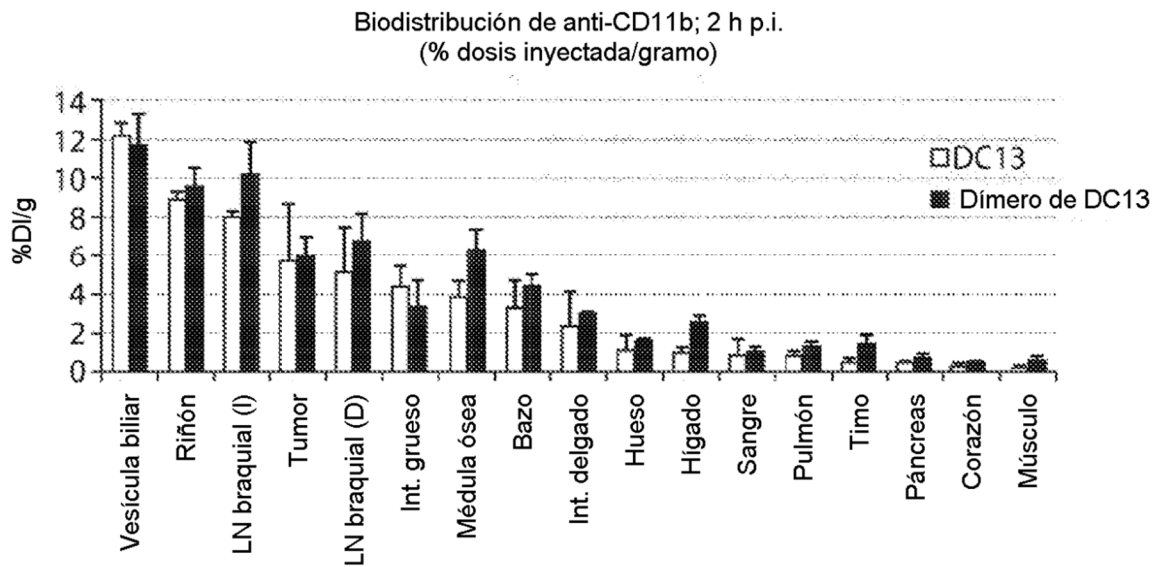


Figura 5A

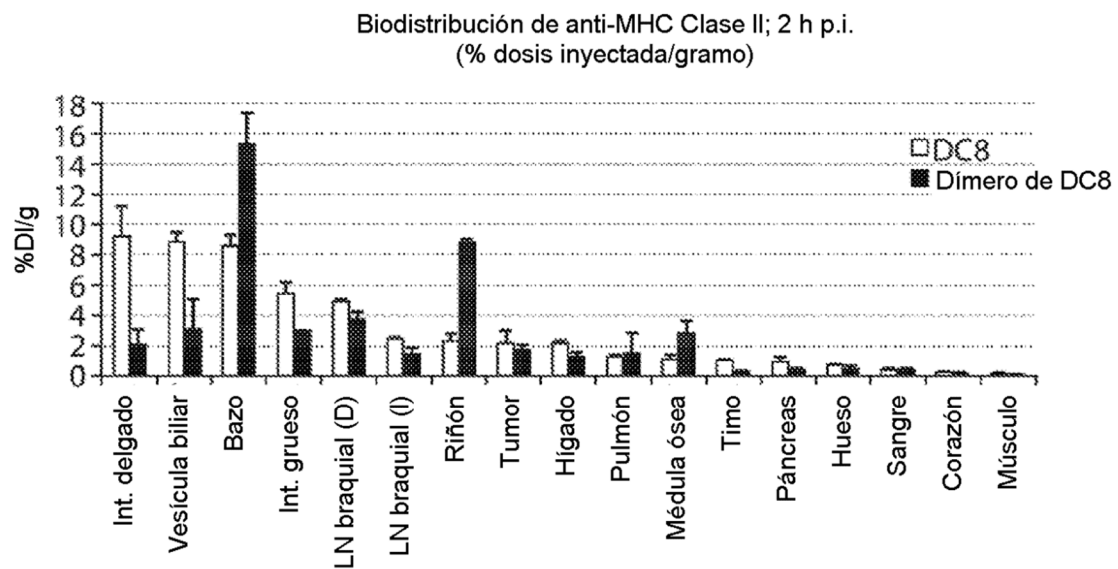


Figura 5B

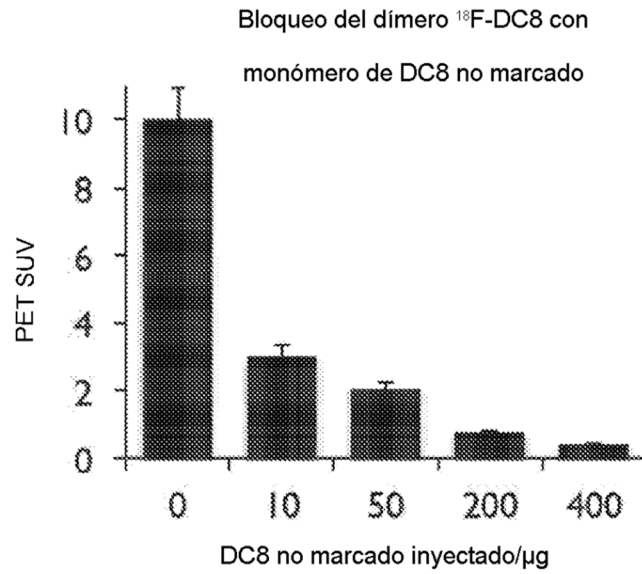


Figura 5C

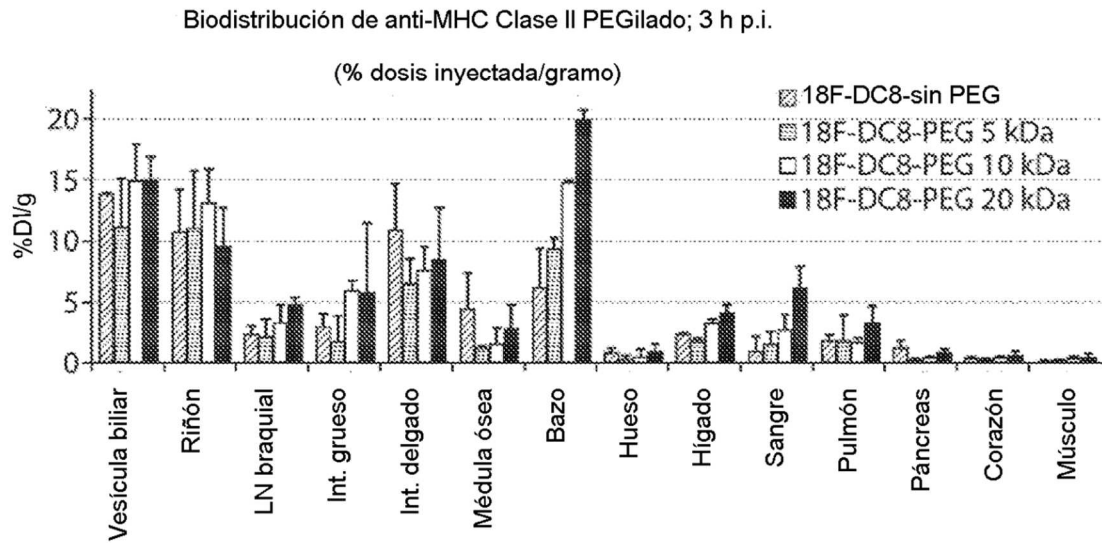


Figura 5D

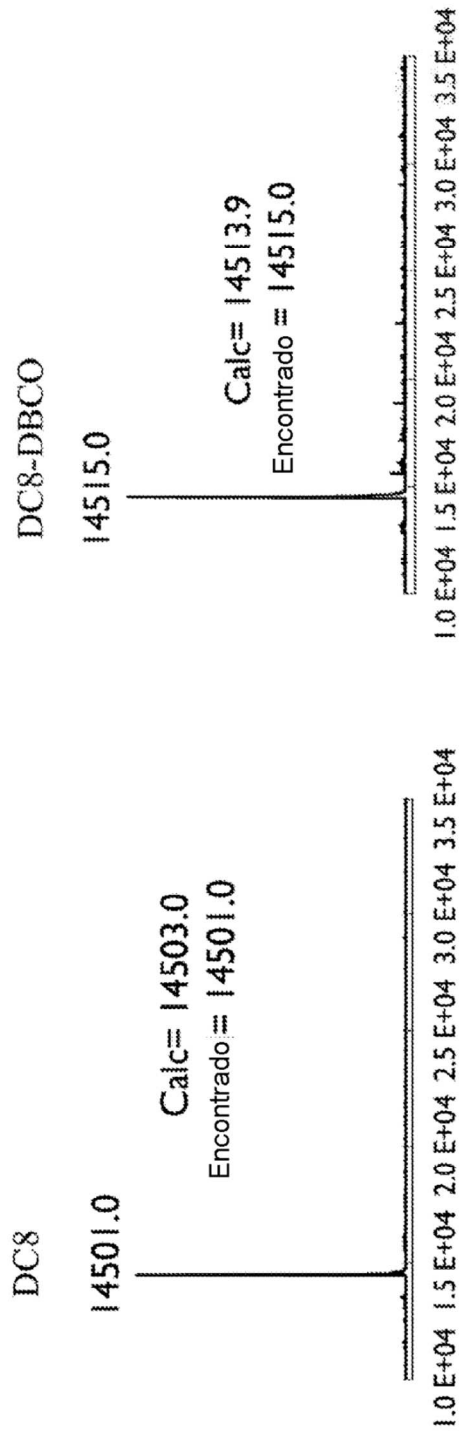


Figura 6A

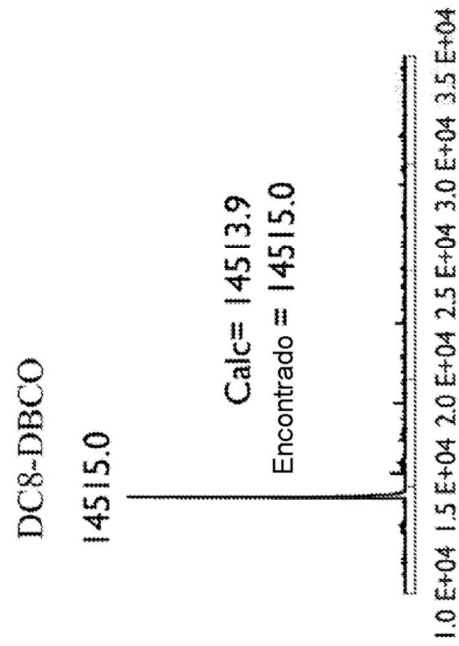


Figura 6B

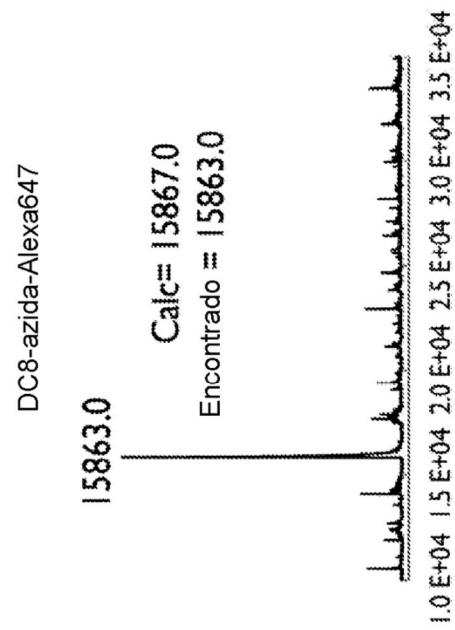


Figura 6C

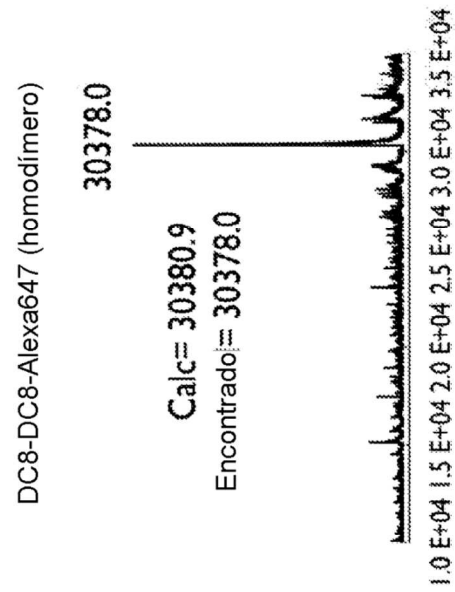


Figura 6D

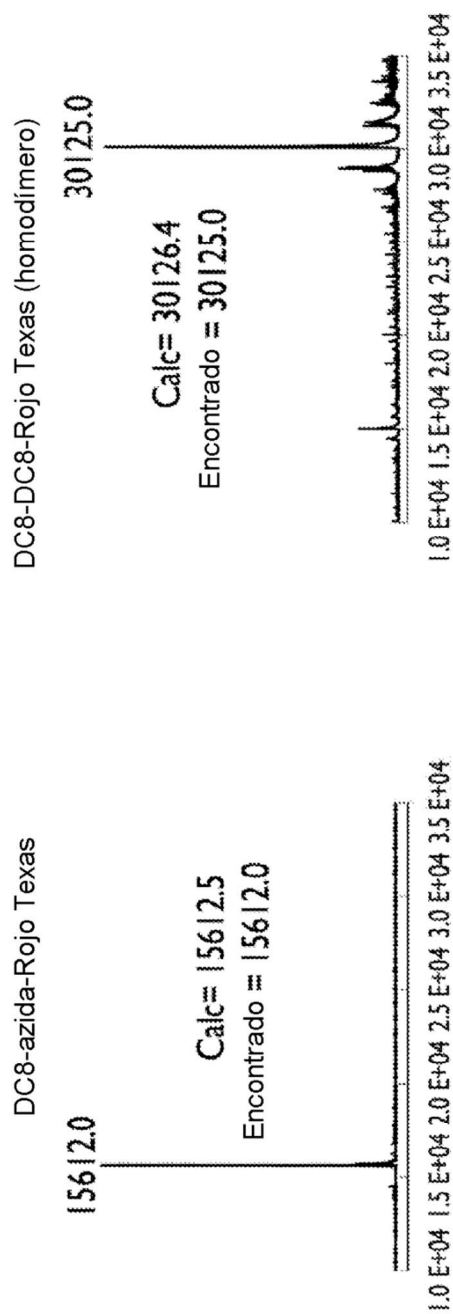


Figura 6E

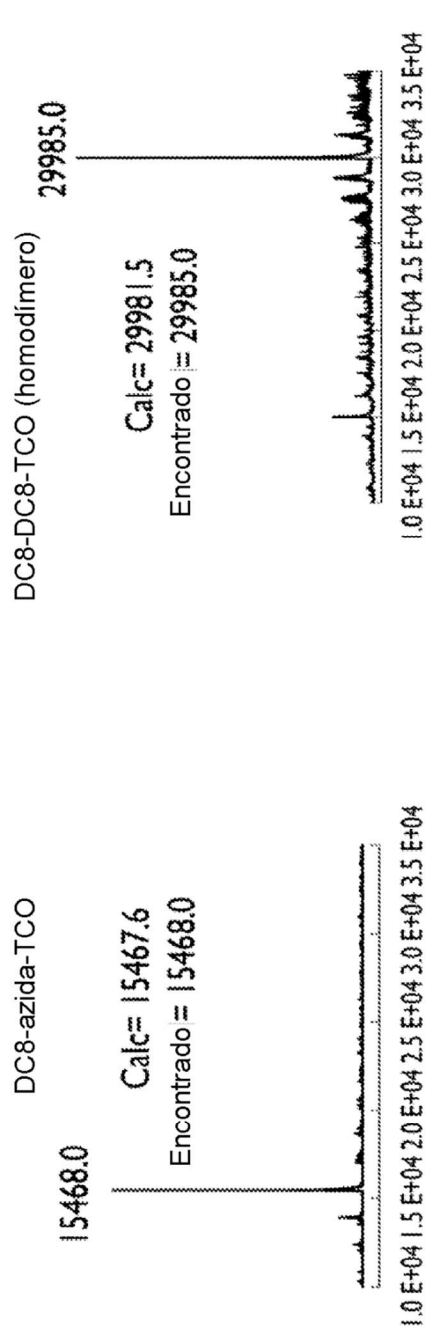


Figura 6G

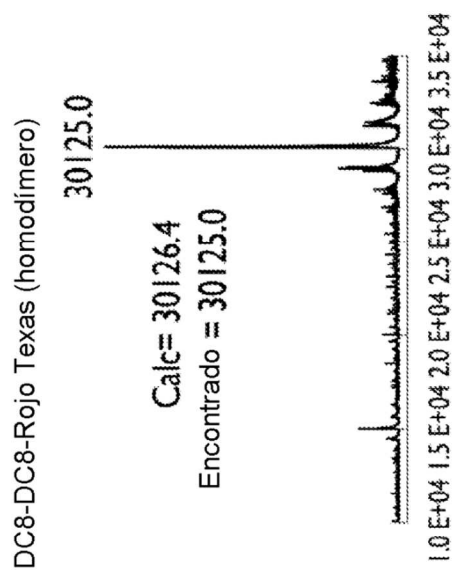


Figura 6F

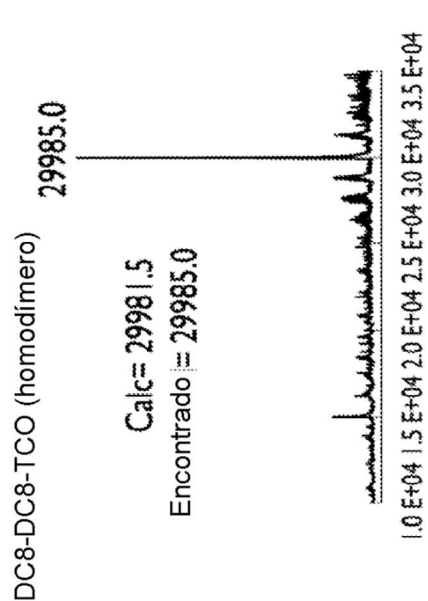


Figura 6H

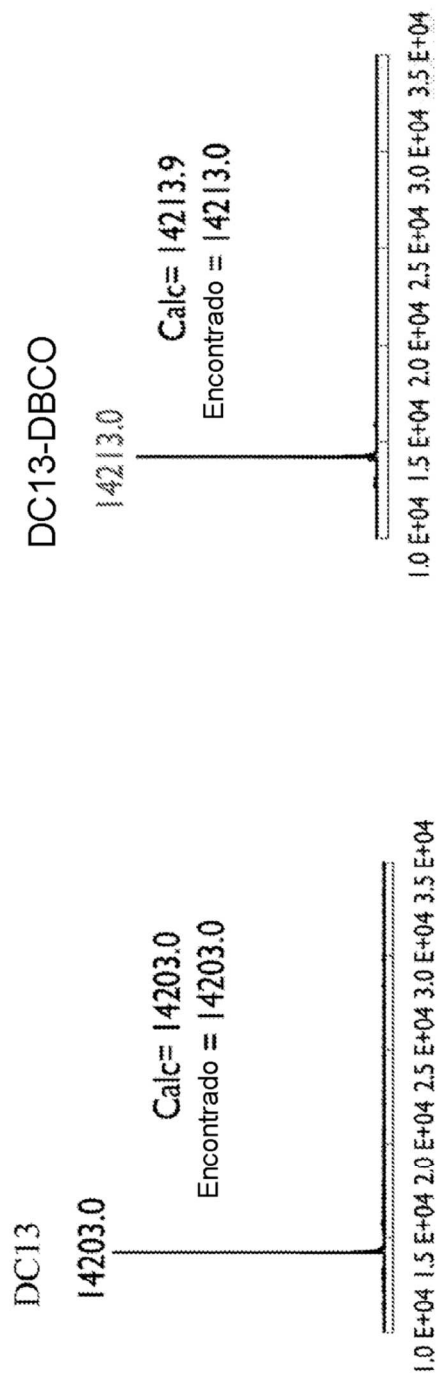


Figura 7A

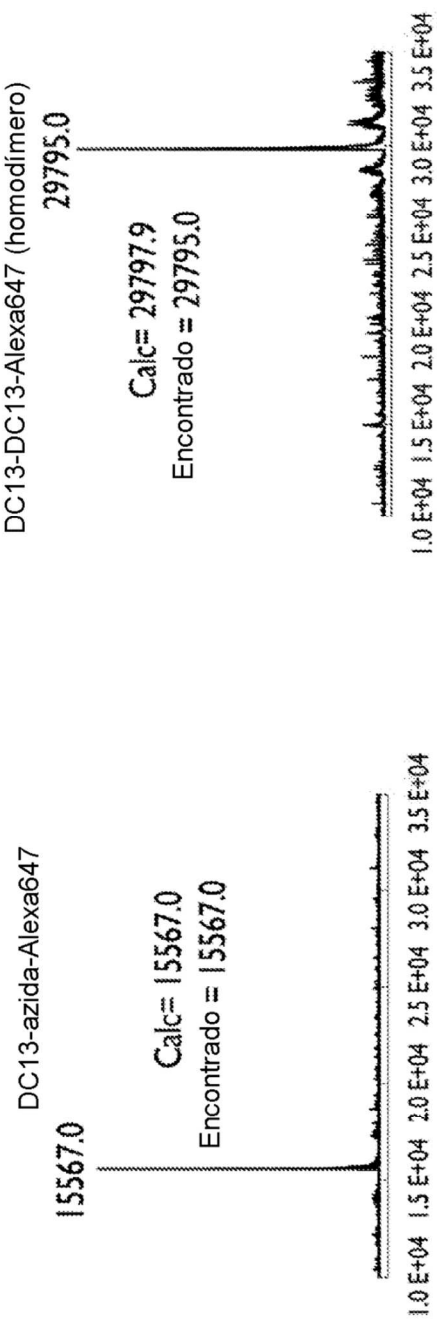


Figura 7C

Figura 7B

Figura 7D



Figura 7E

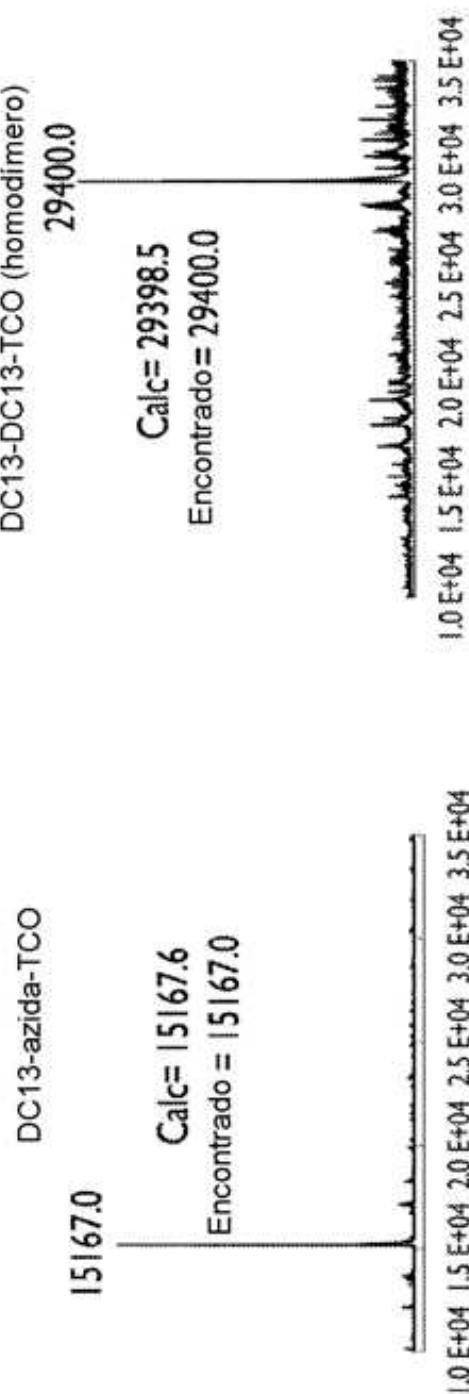


Figura 7G

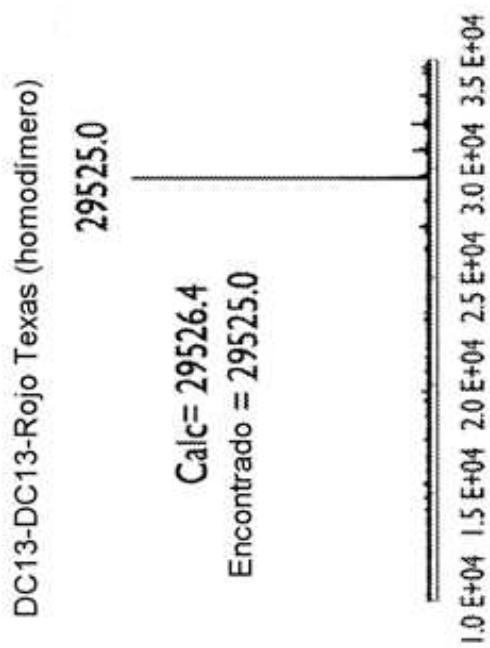


Figura 7F

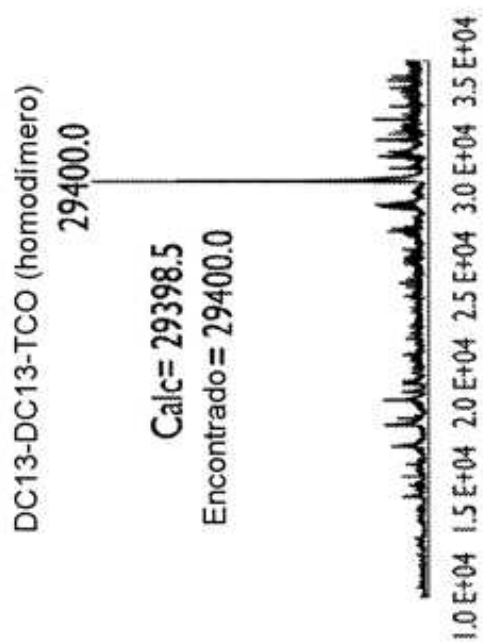


Figura 7H

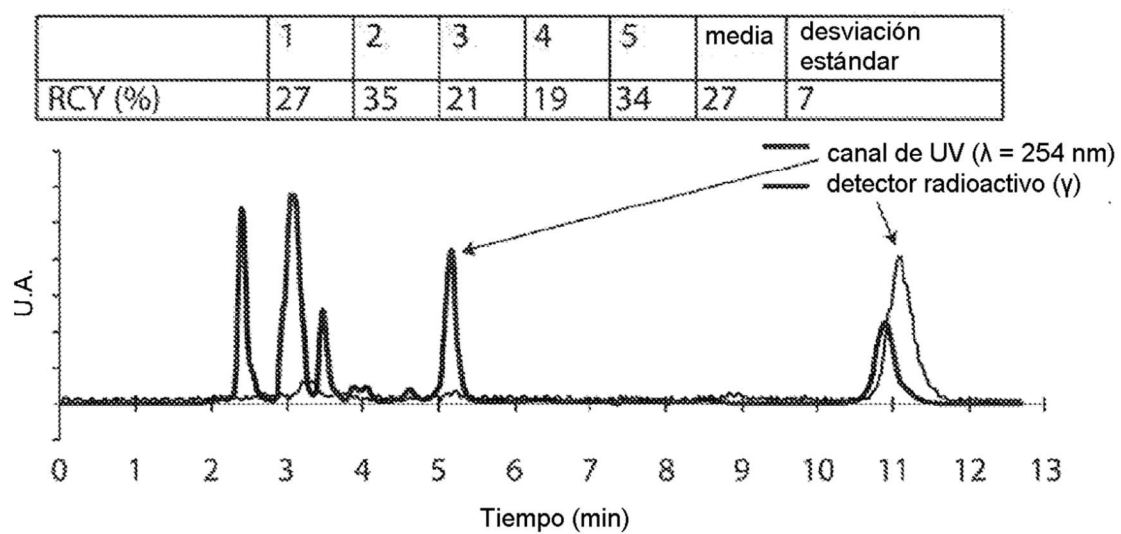


Figura 8

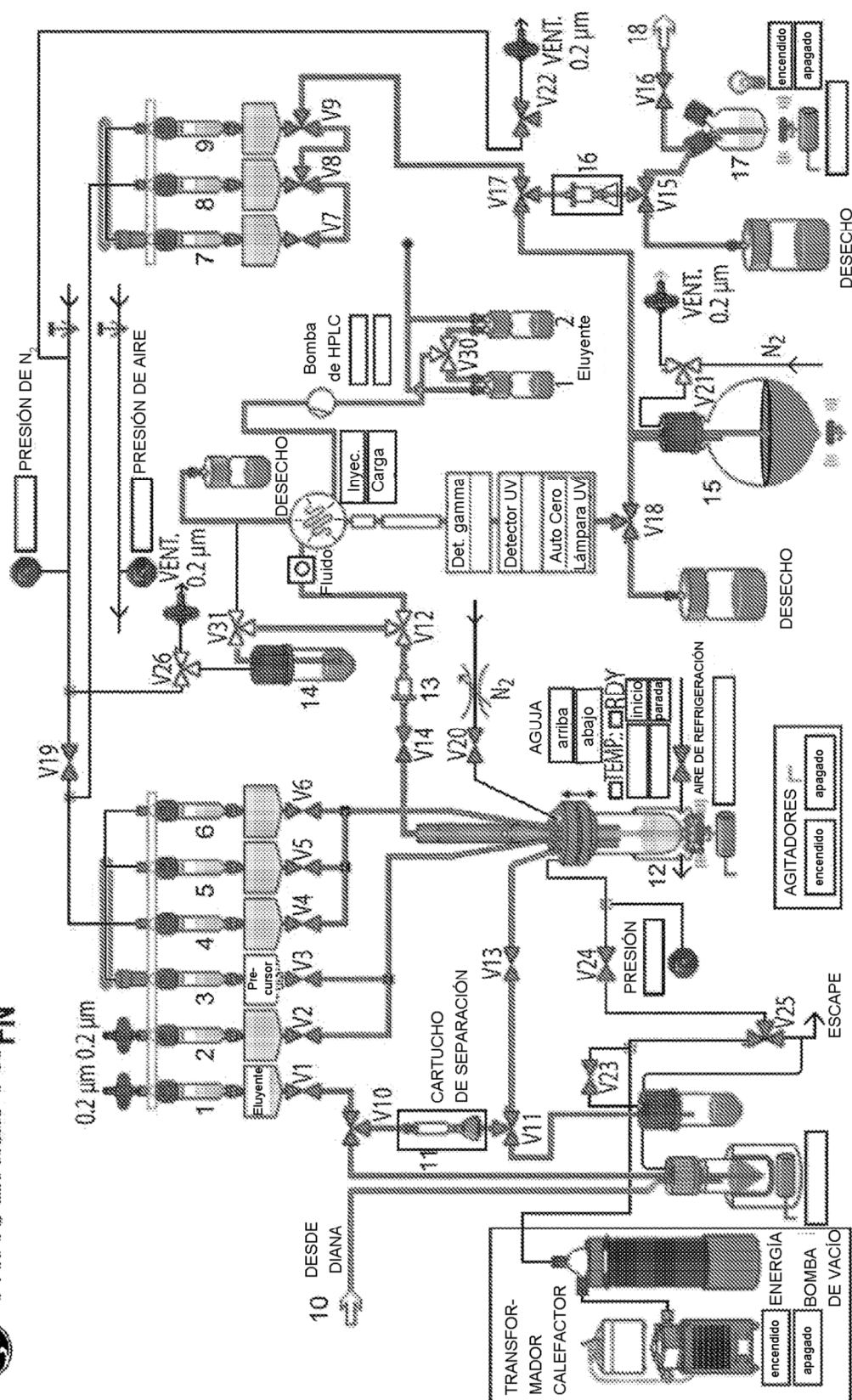


Figura 9

Producto: F-18; Procedimiento: Tz-SFB SL v11032014, N° de Lote: dd,  
Operador: Admin., Comienzo de la síntesis: 1/6(2002 00:52:53, Página 1/1

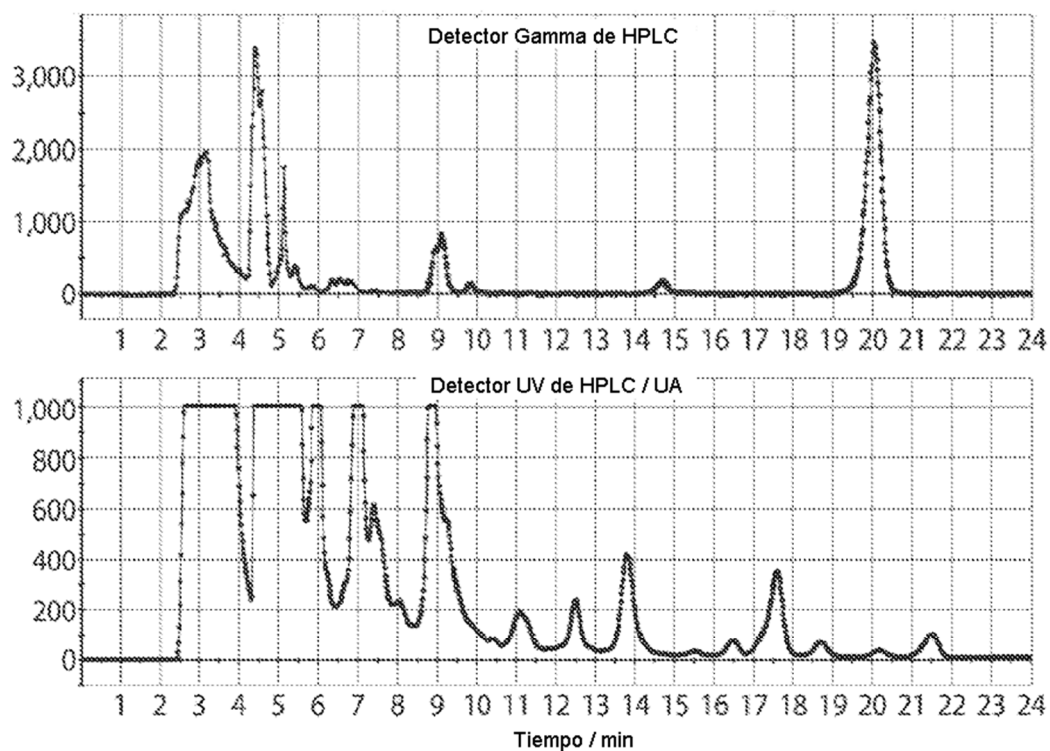


Figura 10

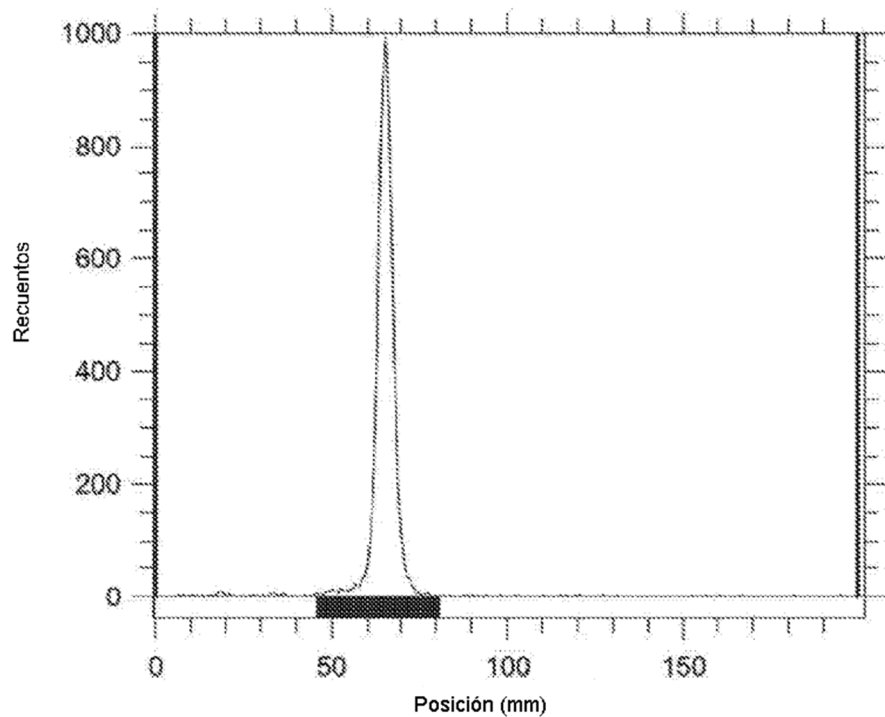


Figura 11A

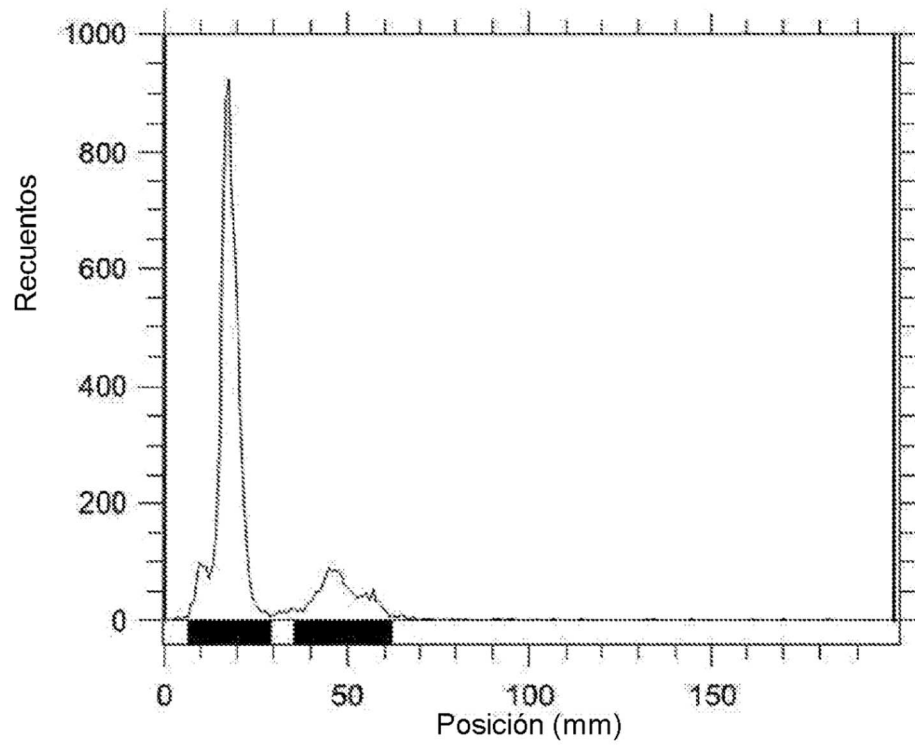


Figura 11B

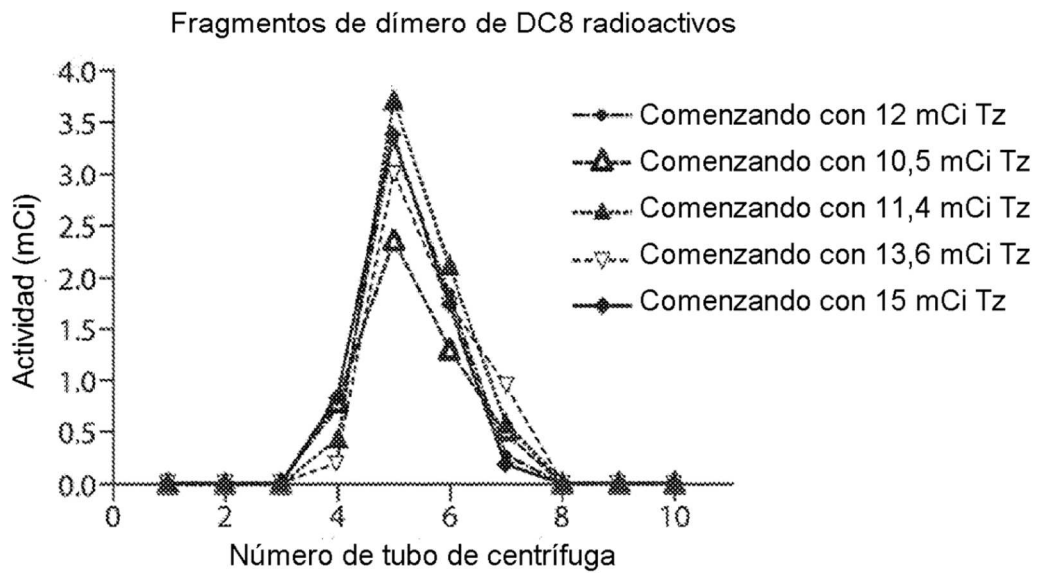
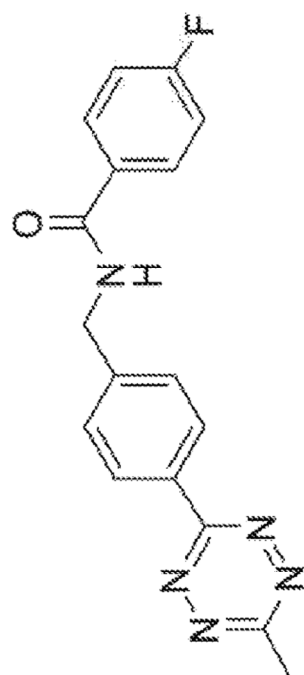


Figura 12



5

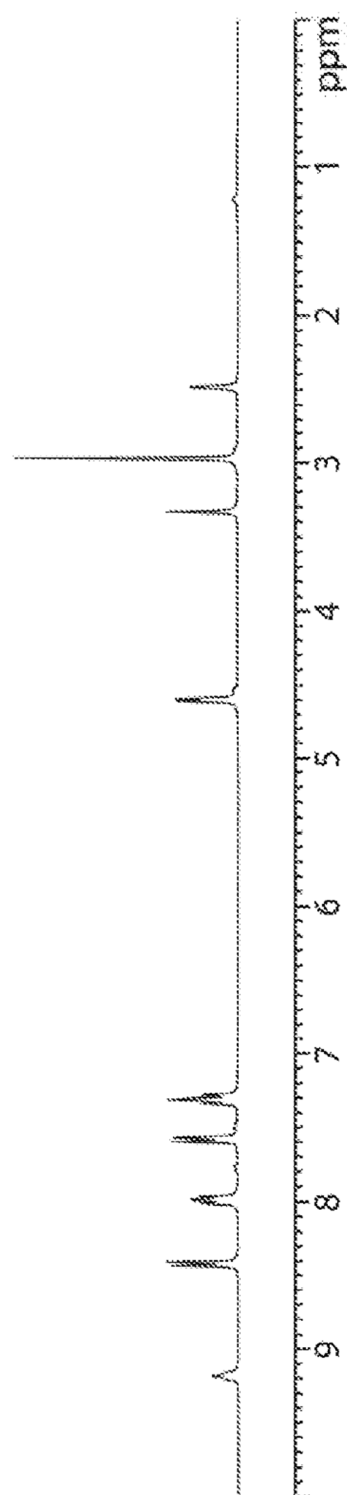


Figura 13A

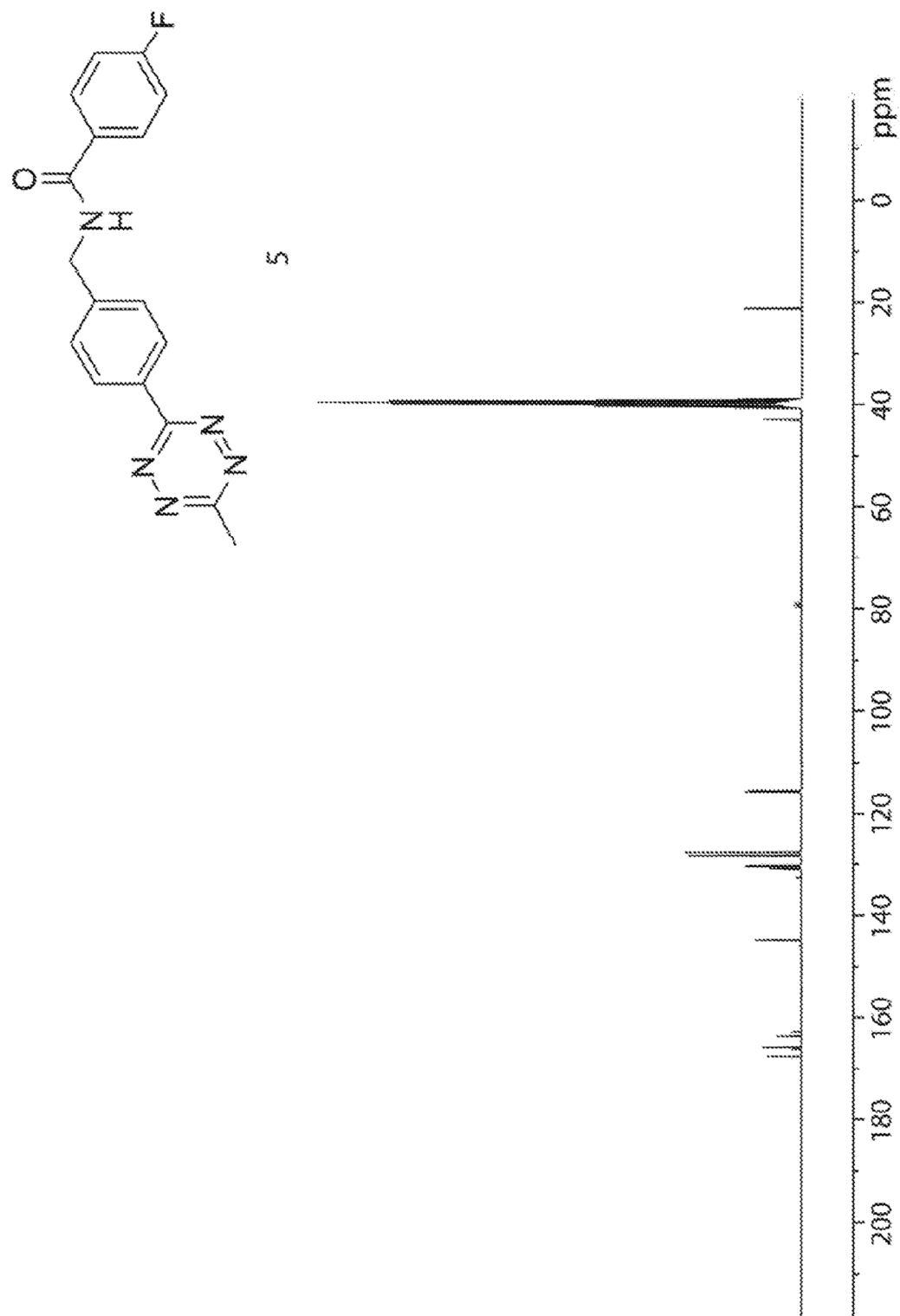


Figure 13B

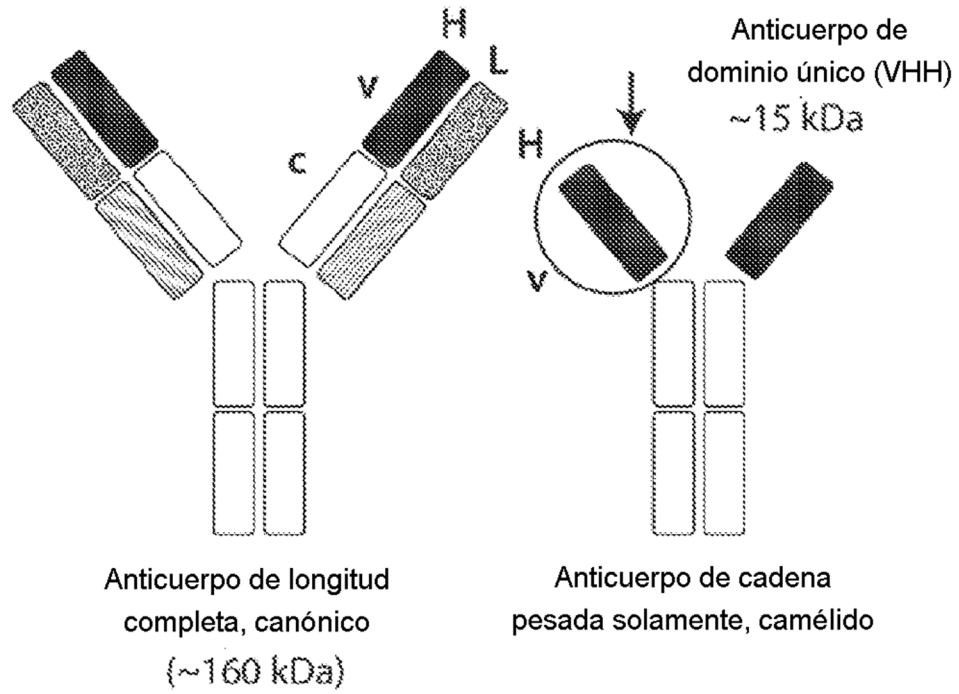


Figura 14A

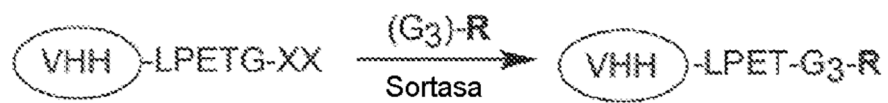


Figura 14B

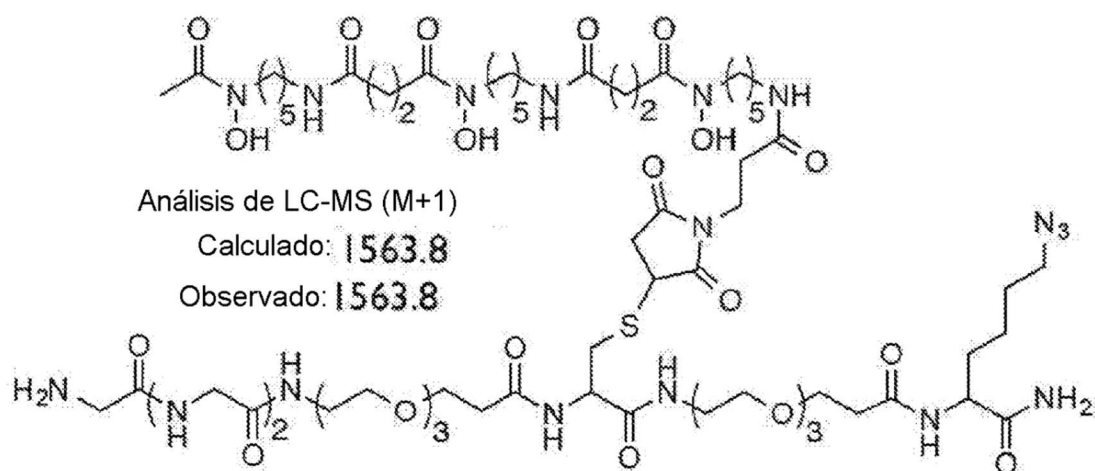


Figura 15A

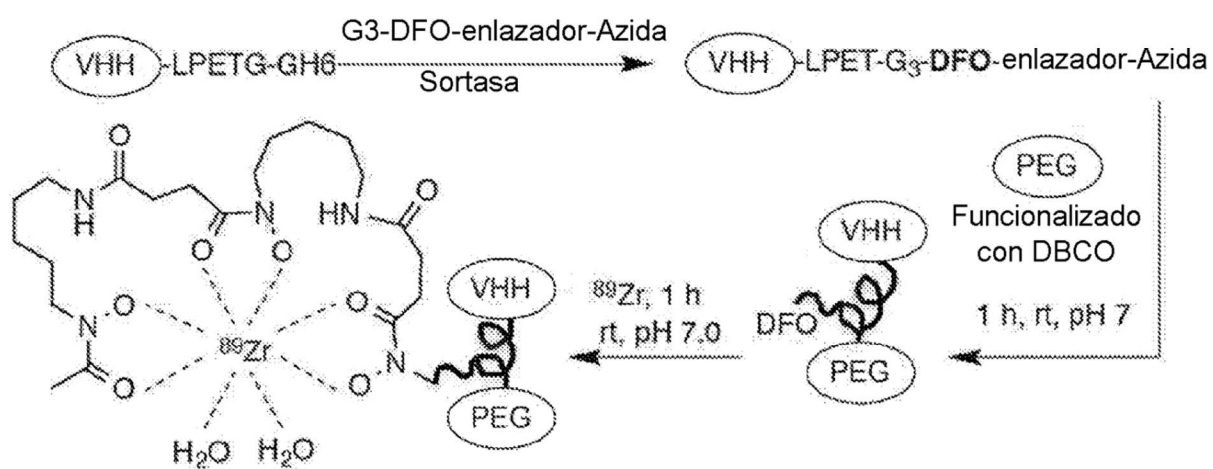


Figura 15B

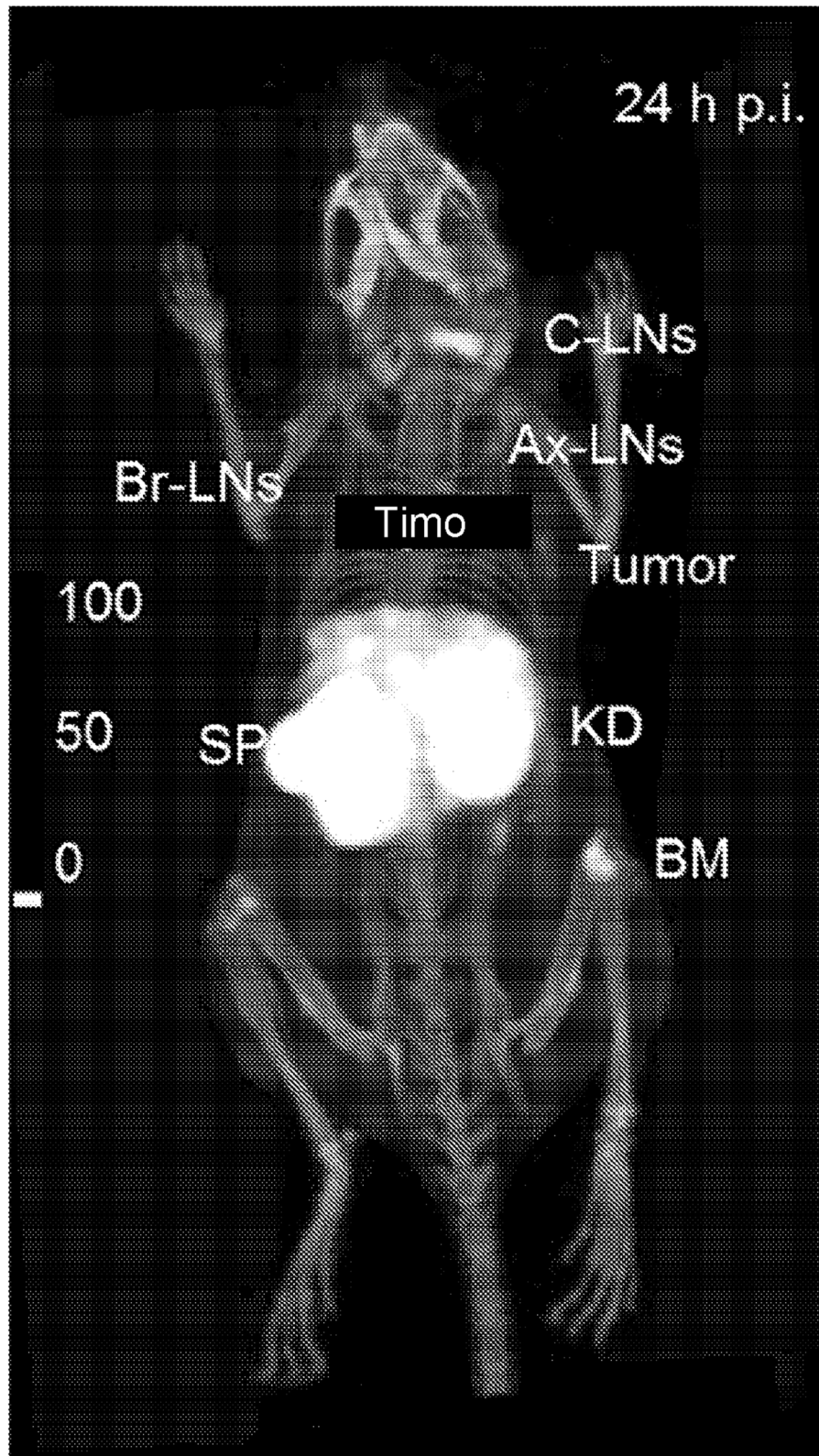


Figura 16A

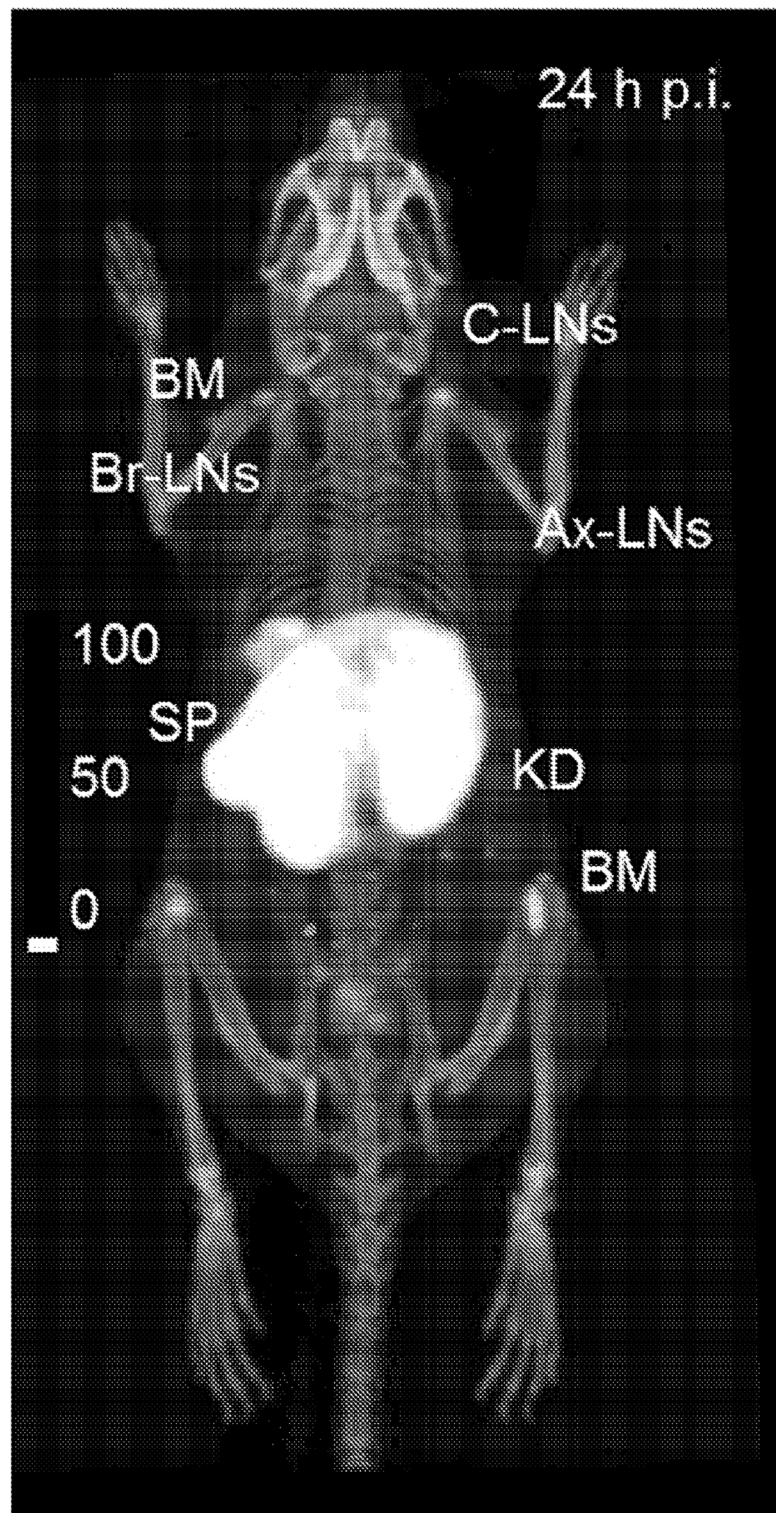


Figura 16B