

INHIBIDORES MARCADOS DE ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO DE MEMBRANA (PSMA), SU USO COMO AGENTES FORMADORES DE IMÁGENES Y AGENTES FARMACÉUTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER DE PRÓSTATA

La presente invención se refiere, en general, al campo de los radiofármacos y a su uso en medicina nuclear como trazadores, agentes formadores de imágenes y para el tratamiento de diversos estados patológicos de cáncer de próstata.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El cáncer de próstata (PCa) es el principal cáncer en los EE.UU. y de la población europea. Al menos 1-2 millones de hombres en el hemisferio occidental padecen cáncer de próstata y se estima que la enfermedad golpeará a uno de cada seis hombres entre las edades de 55 y 85. Se producen más de 300.000 nuevos casos de cáncer de próstata diagnosticados cada año en los EE.UU. La mortalidad de la enfermedad sólo es superada por el cáncer de pulmón. Actualmente métodos anatómicos tales como la tomografía computarizada (CT), formación de imágenes por resonancia magnética (MR) y ultrasonidos, predominan para la formación de imágenes clínica de cáncer de próstata. Se estima que actualmente se destinan 2 billones de \$ en todo el mundo en cirugía, radiación, terapia con medicamentos y tratamientos mínimamente invasivos. Sin embargo, no existe actualmente terapia eficaz alguna para el cáncer de próstata de recaída, metastásico e independiente de andrógenos.

Actualmente se está persiguiendo clínicamente una diversidad de agentes formadores de imágenes de PCa de bajo

- 2 -

peso molecular experimentales, incluyendo análogos de colina radiomarcados [^{18}F]fluorodihidrotestosterona ([^{18}F]FDHT), ácido anti-1-amino-3-[^{18}F]fluorociclobutil-1-carboxílico (anti[^{18}F]F-FACBC, [^{11}C]acetato y 1-(2-desoxi-2-[^{18}F]fluoro-L-arabinofuranosil)-5-metiluracilo (-[^{18}F]FMAU) (Scher, B.; et al. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2007**, 34, 45-53; Rinnab, L.; et al. *BJU Int* **2007**, 100, 786,793; Reske, S.N.; et al. *J Nucl Med* 2006, 47, 1249- 1254; Zophel, K.; Kotzerke, J. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2004**, 31, 756-759; Vees, H.; et al. *BJU Int* **2007**, 99, 1415-1420; Larson, S.M.; et al. *J Nucl Med* **2004**, 45, 366-373; Schuster, D.M.; et al. *J Nucl Med* **2007**, 48, 56-63; Tehrani, O.S.; et al. *J Nucl Med* **2007**, 48, 1436-1441). Cada uno opera por un mecanismo diferente y tiene determinadas ventajas, p. ej., una baja excreción urinaria de [^{11}C]colina, y desventajas tales como la corta semivida física de los radionucleidos emisores de positrones.

Es bien sabido que los tumores pueden expresar proteínas únicas asociadas con su fenotipo maligno, o pueden sobreexpresar proteínas constituyentes normales en mayor número que las células normales. La expresión de proteínas distintas en la superficie de células tumorales ofrece la oportunidad de diagnosticar y caracterizar la enfermedad mediante el sondeo de la identidad fenotípica y la composición bioquímica y la actividad del tumor. Moléculas radiactivas que se unen selectivamente a las proteínas de la superficie celular

- 3 -

específicas del tumor proporcionan una ruta atractiva para la formación de imágenes y el tratamiento de tumores en condiciones no invasivas. Una nueva serie prometedora de agentes formadores de imágenes de bajo peso molecular fija como objetivo el antígeno prostático específico de membrana (PSMA) (Mease R.C. et al. *Clin Cancer Res.* 2008, 14, 3036-3043; Foss, C.A.; et al. *Clin Cancer Res* **2005**, 11, 4022-4028; Pomper, M.G.; et al. *Mol Imaging* 2002, 1, 96-101; Zhou, J.; et al. *Nat Rev Drug Discov* 2005, 4, 1015-1026; documento WO 2013/022797).

PSMA es una glicoproteína de trans-membrana tipo II, de 750 aminoácidos, que tiene una expresión abundante y restringida en la superficie de PCa, en particular, en la enfermedad independiente de andrógenos, avanzada y metastásica (Schulke, N.; et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100, 12590-12595). Esto último es importante, ya que casi todos los PCa se convierten en independientes de andrógenos a lo largo del tiempo. PSMA posee los criterios de una diana prometedora para la terapia, es decir, una expresión abundante y restringida (para la próstata) en todas las etapas de la enfermedad, la presentación en la superficie celular pero no es derramado en la circulación y la asociación con la actividad enzimática o de señalización (Schulke, N.; et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100, 12590-12595). El gen de PSMA está localizado en el brazo corto del cromosoma 11 y funciona tanto como una folato hidrolasa como en calidad de una neuropeptidasa. Tiene función

- 4 -

de neuropeptidasa que es equivalente a glutamato carboxipeptidasa II (GCPII), a la que se alude como el "PSMA del cerebro", y puede modular la transmisión glutamatérgica escindiendo N-acetilaspartilglutamato (NAAG) a N-acetilaspártato (NAA) y glutamato (Nan, F.; et al. *J Med Chem* 2000, 43, 772-774). Existen hasta 10^6 moléculas de PSMA por cada célula cancerígena, lo que sugiere, además, que es un objetivo ideal para la formación de imágenes y la terapia con técnicas basadas en radionucleidos (Tasch, J .; et al. *Crit Rev Immunol* 2001, 21, 249-261).

El radio-inmunoconjugado del anticuerpo monoclonal (mAB) anti-PSMA 7E11, conocido como la exploración PROSTASCINT®, está actualmente siendo utilizado para diagnosticar la metástasis y la recurrencia del cáncer de próstata. Sin embargo, este agente tiende a producir imágenes que son difíciles de interpretar (Lange, P.H. PROSTASCINT P.H. scan for staging prostate cancer. *Urology* **2001**, 57, 402-406; Haseman, M.K.; et al. *Cancer Biother Radiopharm* **2000**, 15, 131-140; Rosenthal, S.A.; et al. *Tech Urol* **2001**, 7, 27-37). Más recientemente, se han desarrollado anticuerpos monoclonales que se unen al dominio extracelular de PSMA y han sido radiomarcados y han demostrado que se acumulan en modelos de tumores de próstata PSMA-positivos en animales. Sin embargo, el diagnóstico y la detección de tumores utilizando anticuerpos monoclonales han sido limitados por la baja permeabilidad del anticuerpo monoclonal en los tumores

- 5 -

sólidos.

La fijación selectiva como objetivo de células cancerígenas con radiofármacos, ya sea con fines de formación de imágenes o terapéuticos es un reto. Una diversidad de radionucleidos son conocidos por ser útiles para la radioformación de imágenes o la radioterapia del cáncer, incluyendo ^{111}In , ^{90}Y , ^{68}Ga , ^{177}Lu , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I e ^{131}I . Recientemente se ha demostrado que algunos compuestos que contienen un elemento de reconocimiento de glutamato-urea-glutamato (GUG) o de glutamato-urea-lisina (GUL) enlazado a un conjugado de radionucleido-ligando exhiben una alta afinidad para PSMA.

Se necesitan nuevos agentes que permitan una rápida visualización del cáncer de próstata y/o una fijación específica como objetivo para permitir la radioterapia presente.

Por lo tanto, el objeto de la presente invención es desarrollar ligandos que interactúen con PSMA y que porten radionucleidos adecuados que proporcionen una opción de fijación como objetivo, prometedora y nueva, para la detección, el tratamiento y la gestión de cáncer de próstata.

SUMARIO DE LA INVENCION

La solución de dicho objeto se consigue proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

Los autores de la invención encontraron nuevos compuestos que son radiofármacos útiles y su uso en medicina nuclear como

- 6 -

trazadores, agentes formadores de imágenes y para el tratamiento de diversos estados patológicos de cáncer de próstata.

Los nuevos agentes formadores de imágenes con modificaciones estructurales en la región de enlazador han mejorado las propiedades de fijación como objetivo y farmacocinéticas del tumor. El farmacóforo presenta tres grupos carboxílicos capaces de interactuar con las respectivas cadenas laterales de PSMA y un oxígeno como parte de la formación de complejos de zinc en el centro activo. Además de estas interacciones obligatorias, los autores de la invención fueron capaces de optimizar las interacciones lipofílicas en la región del enlazador.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Formación de imágenes por PET de MB17

Imágenes microPET coronales de cuerpo entero de ratones inmunológicamente deficientes machos atímicos que portan xenoinjertos de tumores LNCaP. La eficacia de fijación como objetivo de tumores y las propiedades farmacocinéticas de [^{68}Ga]MB17 fueron evaluadas mediante exploraciones microPET dinámicas. Se inyectaron aproximadamente 15 MBq/ratón. El gráfico A muestra las respectivas curvas de tiempo-actividad de riñón y vejiga y el gráfico B las respectivas curvas de tiempo-actividad de corazón, músculo y tumor. Los valores se expresan como SUV (valores de absorción estandarizados) medios.

Figura 2: Distribución en Órganos 1 h post-inyección

La distribución en órganos a una hora post-inyección de 0.06 nmol del inhibidor MB17 de PSMA marcado con ^{68}Ga . El bloqueo de PSMA mediante co-administración de 2 mg/kg de peso corporal de 2-PMPA indica la absorción específica para PSMA en el tumor y los riñones. Los datos se expresan como la media de % ID/g de tejido $\pm$ SD (n = 3).

Figura 3: Formación de imágenes por PET de MB4

Imágenes microPET coronales de cuerpo entero de ratones inmunológicamente deficientes machos atímicos que portan xenoinjertos de tumores LNCaP. La eficacia de fijación como objetivo de tumores y las propiedades farmacocinéticas de [^{68}Ga]MB4 fueron evaluadas mediante exploraciones microPET dinámicas. Se inyectaron aproximadamente 15 MBq/ratón. El gráfico A muestra las respectivas curvas de tiempo-actividad de riñón y vejiga y el gráfico B las respectivas curvas de tiempo-actividad de corazón, músculo y tumor. Los valores se expresan como SUV (valores de absorción estandarizados) medios.

Figura 4: Distribución en órganos expresada como % ID/g de tejido $\pm$ SD (n = 5) 24 h post-inyección de 0.06 nmol del MB17 marcado con ^{177}Lu

La distribución en órganos con ^{177}Lu muestra que la absorción renal inicial alta está casi eliminada completamente por lavado ($2.13 \pm 1.36\%$ ID/g) después de 24 horas, mientras que la absorción tumoral se mantuvo alta e incluso aumentó

- 8 -

($10.58 \pm 4.50\%$ ID/g). Otros órganos tales como el hígado ($0.08 \pm 0.03\%$ ID/g), el pulmón ($0.11 \pm 0.13\%$ ID/g) y el bazo ($0.13 \pm 0.05\%$ ID/g) mostraron una muy baja absorción. La farmacocinética favorables condujo a relaciones extremadamente altas tumor-a-fondo (Tumor/Sangre: 1058; Tumor/Músculo: 529) después de 24 horas.

Figura 5: Formación de imágenes por PET de MB2

Imágenes microPET coronales de cuerpo entero de un ratón inmunológicamente deficiente macho atímico que porta xenoinjertos de tumores LNCaP. La eficacia de fijación como objetivo de tumores y las propiedades farmacocinéticas de [^{68}Ga]MB2 fueron evaluadas mediante exploraciones microPET dinámicas. Se inyectaron aproximadamente 15 MBq/ratón.

Figura 6: Formación de imágenes por PET de MB3

Imágenes microPET coronales de cuerpo entero de un ratón inmunológicamente deficiente macho atímico que porta xenoinjertos de tumores LNCaP. La eficacia de fijación como objetivo de tumores y las propiedades farmacocinéticas de [^{68}Ga]MB3 fueron evaluadas mediante exploraciones microPET dinámicas. Se inyectaron aproximadamente 15 MBq/ratón.

Figura 7: Formación de imágenes por PET de MB10

Imágenes microPET coronales de cuerpo entero de un ratón inmunológicamente deficiente macho atímico que porta xenoinjertos de tumores LNCaP. La eficacia de fijación como objetivo de tumores y las propiedades farmacocinéticas de

- 9 -

[⁶⁸Ga]MB10 fueron evaluadas mediante exploraciones microPET dinámicas. Se inyectaron aproximadamente 15 MBq/ratón.

Figura 8: Formación de imágenes por PET de MB17D

Imágenes microPET coronales de cuerpo entero de un ratón inmunológicamente deficiente macho atímico que porta xenoinjertos de tumores LNCaP. La eficacia de fijación como objetivo de tumores y las propiedades farmacocinéticas de [⁶⁸Ga]MB17D fueron evaluadas mediante exploraciones microPET dinámicas. Se inyectaron aproximadamente 15 MBq/ratón.

MB17D: estereoisómero de MB17(L); síntesis basada en Fmoc-3(2-naftil)-D-alanina

Figura 9: Formación de imágenes por PET de MB22

Imágenes microPET coronales de cuerpo entero de un ratón inmunológicamente deficiente macho atímico que porta xenoinjertos de tumores LNCaP. La eficacia de fijación como objetivo de tumores y las propiedades farmacocinéticas de [⁶⁸Ga]MB22 fueron evaluadas mediante exploraciones microPET dinámicas. Se inyectaron aproximadamente 15 MBq/ratón.

Figura 10: Formación de imágenes por PET de MB24

Imágenes microPET coronales de cuerpo entero de un ratón inmunológicamente deficiente macho atímico que porta xenoinjertos de tumores LNCaP. La eficacia de fijación como objetivo de tumores y las propiedades farmacocinéticas de [⁶⁸Ga]MB24 fueron evaluadas mediante exploraciones microPET dinámicas. Se inyectaron aproximadamente 15 MBq/ratón.

Figura 11: Formación de imágenes por PET de MB25

Imágenes microPET coronales de cuerpo entero de un ratón inmunológicamente deficiente macho atímico que porta xenoinjertos de tumores LNCaP. La eficacia de fijación como objetivo de tumores y las propiedades farmacocinéticas de [^{68}Ga]MB25 fueron evaluadas mediante exploraciones microPET dinámicas. Se inyectaron aproximadamente 15 MBq/ratón.

Figura 12: Formación de imágenes por PET de MB31

Imágenes microPET coronales de cuerpo entero de un ratón inmunológicamente deficiente macho atímico que porta xenoinjertos de tumores LNCaP. La eficacia de fijación como objetivo de tumores y las propiedades farmacocinéticas de [^{68}Ga]MB31 fueron evaluadas mediante exploraciones microPET dinámicas. Se inyectaron aproximadamente 15 MBq/ratón.

Figura 13: Formación de imágenes por PET de MB33

Imágenes microPET coronales de cuerpo entero de un ratón inmunológicamente deficiente macho atímico que porta xenoinjertos de tumores LNCaP. La eficacia de fijación como objetivo de tumores y las propiedades farmacocinéticas de [^{68}Ga]MB33 fueron evaluadas mediante exploraciones microPET dinámicas. Se inyectaron aproximadamente 15 MBq/ratón.

Figura 14: Formación de imágenes por PET de MB35

Imágenes microPET coronales de cuerpo entero de un ratón inmunológicamente deficiente macho atímico que porta xenoinjertos de tumores LNCaP. La eficacia de fijación como

- 11 -

objetivo de tumores y las propiedades farmacocinéticas de [^{68}Ga]MB35 fueron evaluadas mediante exploraciones microPET dinámicas. Se inyectaron aproximadamente 15 MBq/ratón.

Figura 15: Exploración PET de un ratón al que se inyectó ^{68}Ga -CHX-DTPA.

A la izquierda la vista caudal, en el centro la vista dorsal y a la derecha la vista lateral. Las imágenes cubren los intervalos de tiempo de 20-40 min (arriba), 40-60 min (centro) y 120-140 min (parte inferior).

Fig. 16: MB-17 frente a MB-17D

Imágenes microPET coronales de cuerpo entero de un ratón inmunológicamente deficiente macho atímico que porta xenoinjertos de tumores LNCaP. La eficacia de fijación como objetivo de tumores y las propiedades farmacocinéticas de los estereoisómeros MB-17 y MB-17 D se compararon directamente a las 2 horas post-inyección.

Fig. 17: Formación de imágenes por PET/CT humano de MB17 marcado con ^{68}Ga

(a) La primera experiencia clínica con PET/CT de MB17 marcado con ^{68}Ga demuestra la detección de pequeñas metástasis en los ganglios linfáticos 1 h post-inyección, debido principalmente a una elevada absorción de radiotrazador. Las flechas en rojo apuntan a una lesión representativa con un SUV_{máx} de 36.5 y una relación de tumor-a-fondo de 52.1 una hora post-inyección. MIP = proyección de intensidad máxima de la

- 12 -

PET 1 h post-inyección.

(b) La ventaja significativa de PET/CT de MB17 marcado con ^{68}Ga es la detección sensible de lesiones, incluso a una baja concentración de PSA.

Fig. 18: Formación de imágenes por PET de pacientes con metástasis de cáncer de próstata múltiple

(a) La primera exploración demuestra una formación inicial de imágenes PET del paciente con múltiples metástasis de cáncer de próstata con un índice de PSA en la sangre de 14. Dos meses más tarde se aplicaron 3.3 GBq de MB17 marcado con ^{177}Lu . En este instante, la cantidad de PSA en la sangre alcanzó un valor de 38. Después del primer ciclo, el nivel de PSA disminuyó a 8. Tres meses después del primer ciclo se aplicaron otros 4 GBq de MB17 marcado con ^{177}Lu . La exploración por PET control se realizó un mes después del segundo ciclo. El tratamiento ha demostrado un impacto significativo en las lesiones tumorales y el valor de PSA y resultó en una reducción del dolor de los huesos.

(b) El gráfico demuestra el impacto significativo sobre el valor de PSA que disminuyó después de la primera aplicación de la dosis terapéutica de MB17 marcado con ^{177}Lu .

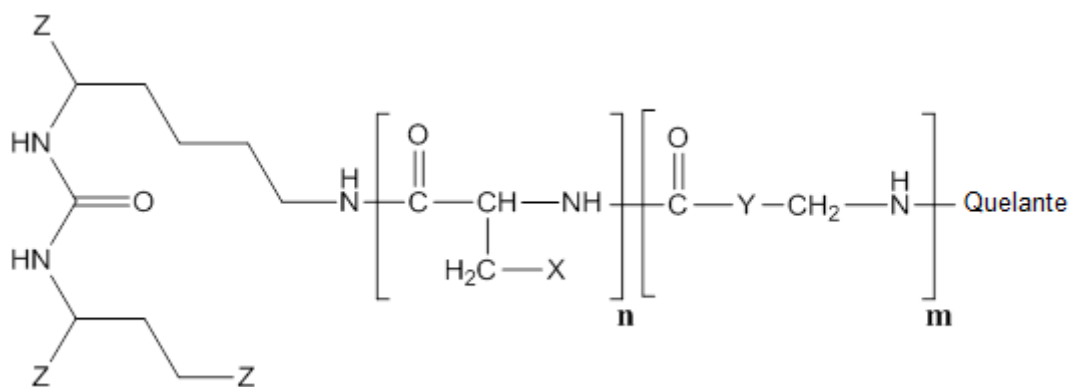
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a radiofármacos y a su uso en medicina nuclear como trazadores, agentes formadores de imágenes y para el tratamiento de diversos estados patológicos

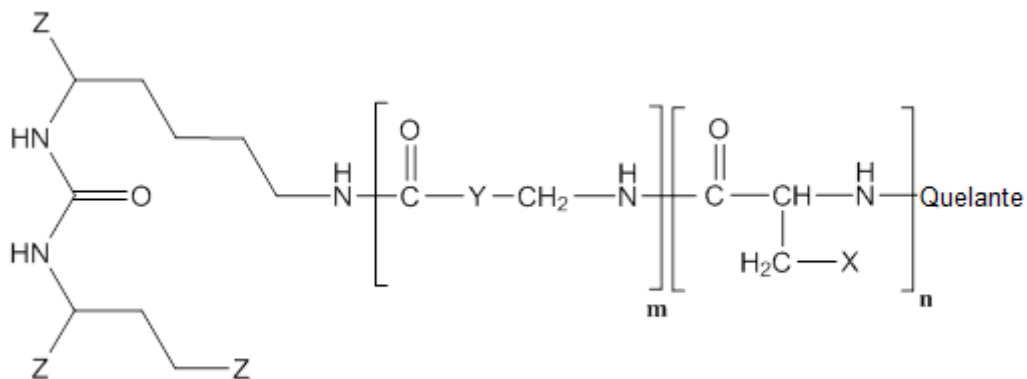
de cáncer de próstata.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a compuestos que están representados por las Fórmulas generales (Ia) o (Ib):

- 14 -

Fórmula (Ia)

○

Fórmula (Ib)

con:

n:	0, 1
m:	1, 2, 3, 4
Z:	-CO ₂ H, -SO ₂ H, -SO ₃ H, -SO ₄ H, -PO ₂ H, -PO ₃ H, -PO ₄ H ₂
X:	Naftilo, Fenilo, Bifenilo, Indolilo (=2,3-benzopirrolilo), Benzotiazolilo
Y:	Arilo, Alquilarilo, Ciclopentilo, Ciclohexilo, Cicloheptilo

- 15 -

Quelante radical de:	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (= DOTA), Ácido N,N''-bis[2-hidroxi-5-(carboxietil)bencil]etilendiamina-N,N''-diacético (= HBED-CC), Ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (= NOTA), Ácido 2-(4,7-bis(carboximetil)-1,4,7-triazonan-1-il)pentanodioico (NODAGA), Ácido 2-(4,7,10-tris(carboximetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1-il)pentanodioico (DOTAGA), Ácido 1,4,7-triazaciclononano-fosfínico (TRAP), 1,4,7-triazaciclononano-1-[ácido metil(2-carboxietil) fosfínico]-4,7-bis[ácido metil(2-hidroximetil) fosfínico] (NOPO), Ácido 3,6,9,15-tetraazabicciclo[9.3.1.] pentadeca-1(15),11,13-trieno-3,6,9-triacético (= PCTA), N'-{5-[acetil(hidroxi) amino]pentil}-N-[5-({4-[(5-aminopentil)(hidroxi) amino]-4-oxobutanoil} amino)pentil]-N-hidroxisuccinamida (DFO), Ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) Ácido trans-ciclohexil-dietilentriaminopentaacético (CHX-DTPA) Ácido 1-oxa-4,7,10-triazaciclododecano-4,7,10-
----------------------	---

- 16 -

	triacético (oxo-Do3A)
	p-isotiocianatobencil-DTPA (SCN-Bz-DTPA)
	1-(p-isotiocianatobencil)-3-metil-DTPA (1B3M)
	2-(p-isotiocianatobencil)-4-metil-DTPA (1M3B)
	1-(2)-metil-4-isocianatobencil-DTPA (MX-DTPA)

Si no se indica lo contrario, en la presente invención el residuo "alquilo" (preferiblemente: C₁ a C₁₀) puede ser lineal o ramificado, no sustituido o sustituido. Residuos alquilo preferidos son metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, terc-butilo, n-pentanilo, n-hexanilo. Lo mismo se aplica también a los compuestos cicloalquilo correspondientes que tienen preferiblemente 3 a 10 átomos de carbono.

"Arilo" se refiere a un sistema de anillo monocíclico o policíclico aromático que tiene 6 a 14 átomos de carbono, preferiblemente 6 a 10 átomos de carbono. El grupo arilo puede estar sustituido, en caso apropiado, con uno o varios sustituyentes en el anillo tales como grupos alquilo. Grupos arilo preferidos son fenilo, bencilo o naftilo.

Aunque se prefiere que el grupo Z sea -CO₂H, éste puede ser fácilmente reemplazado por reemplazos biostéricos tales como -SO₂H, -SO₃H, -SO₄H, -PO₂H, -PO₃H, -PO₄H₂, véase, p. ej., "The Practice of Medicinal Chemistry" (Academic Press Nueva York, 1996), página 203.

En el sentido de la invención, todos los residuos se consideran combinables, a menos que se indique lo contrario en

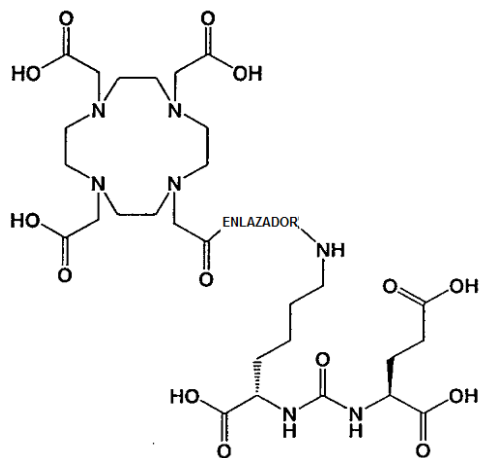
- 17 -

la definición de los residuos. Se considera que quedan descritos todos los subgrupos concebibles de los mismos.

En una realización preferida, el motivo que se une específicamente a membranas celulares de las células neoplásicas es un motivo de unión específica a las membranas celulares de células cancerosas, preferiblemente en donde dicho motivo comprende un antígeno de membrana específico para la próstata (PSMA), en particular en donde dicho PSMA comprende un motivo de glutamato-urea-lisina de acuerdo con la fórmula siguiente en el Esquema 1.

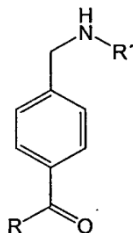
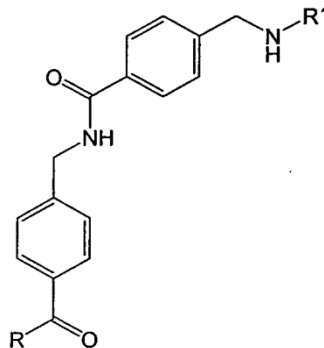
Por lo tanto, moléculas preferidas de la presente invención consisten en tres componentes principales (Esquema 1): el motivo de unión hidrófilo de PSMA (Glu-urea-Lys; = Glu-NH-CO-NH-Lys), un enlazador variable y el quelante que es preferiblemente radical de DOTA.

Esquema 1: Estructura de compuestos preferidos de la presente invención

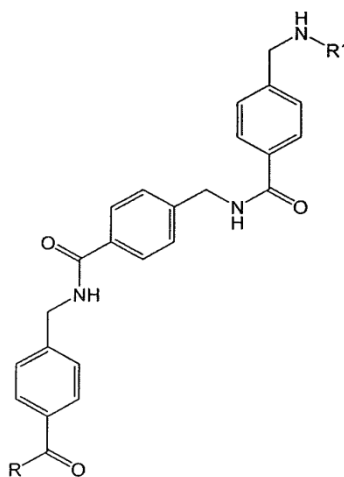
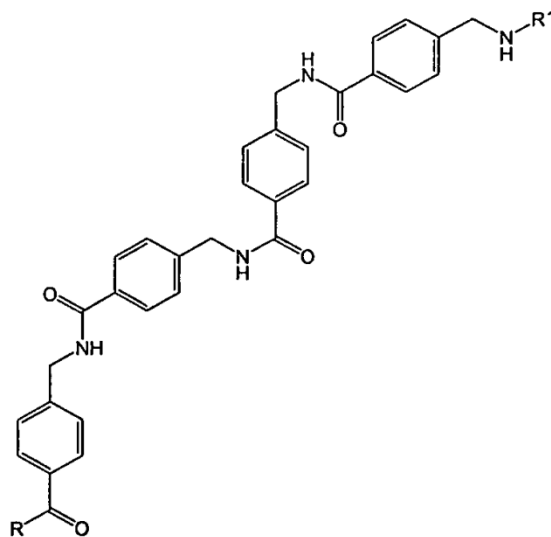


- 18 -

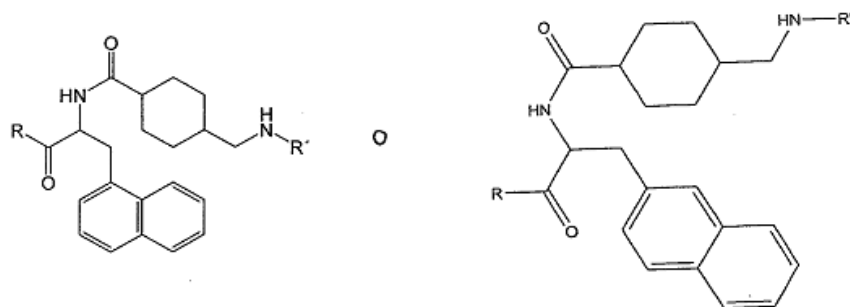
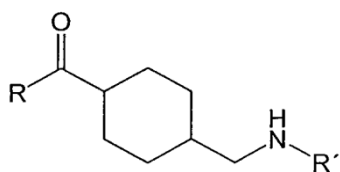
A continuación, se muestran los distintos enlazadores preferidos, en donde R = radical de Glu-urea-Lys y R' = radical de DOTA (como un ejemplo preferido para el quelante), tal como se muestra arriba.

**Enlazador MB2**Fórmula química: $C_{36}H_{54}N_8O_{15}$ Peso molecular: **838,88** g/mol**Enlazador MB3**Fórmula química: $C_{44}H_{61}N_9O_{16}$ Peso molecular: **972,03** g/mol

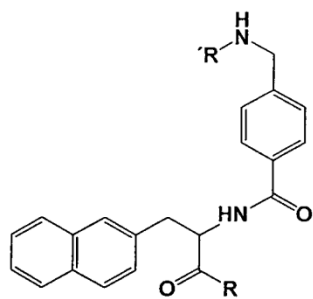
- 19 -

**Enlazador MB4**Fórmula química: $C_{52}H_{68}N_{10}O_{17}$ Peso molecular: **1105,18** g/mol**Enlazador MB10**Fórmula química: $C_{65}H_{70}N_{11}O_8$ Peso molecular: **1238,33** g/mol

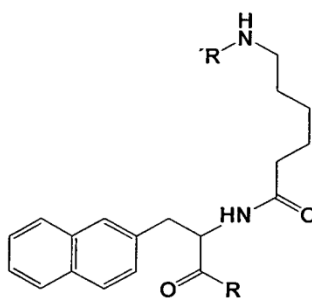
- 20 -

**Enlazador MB17**Fórmula química: $C_{49}H_{71}N_9O_{16}$ Peso molecular: **1042,16** g/mol**Enlazador MB22**Fórmula química: $C_{36}H_{60}N_8O_{15}$ Peso molecular: **844,92** g/mol

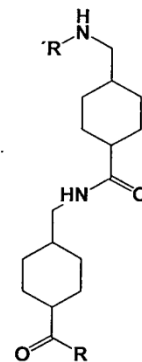
MB24



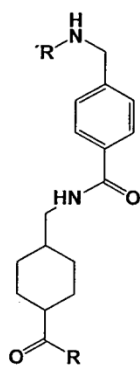
MB25



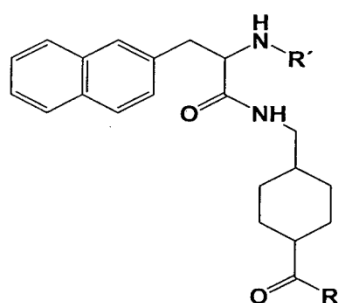
MB31



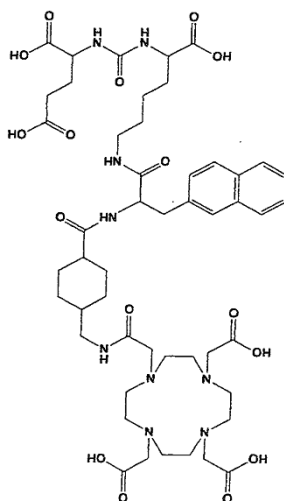
MB33



MB35

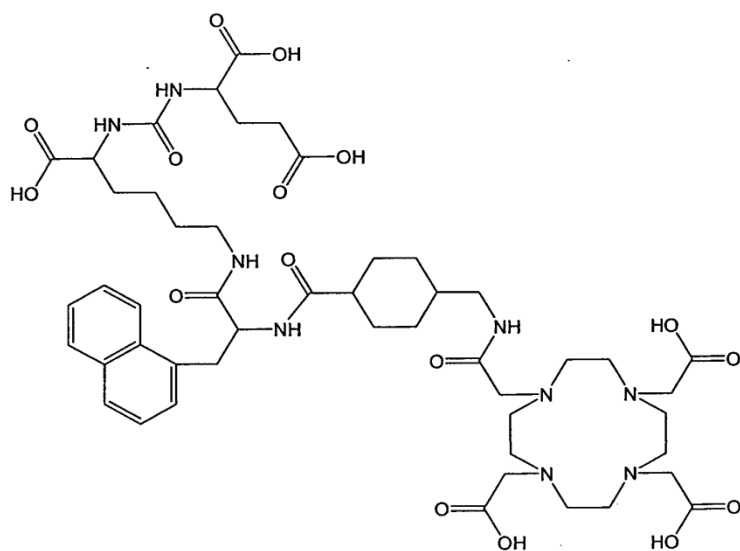
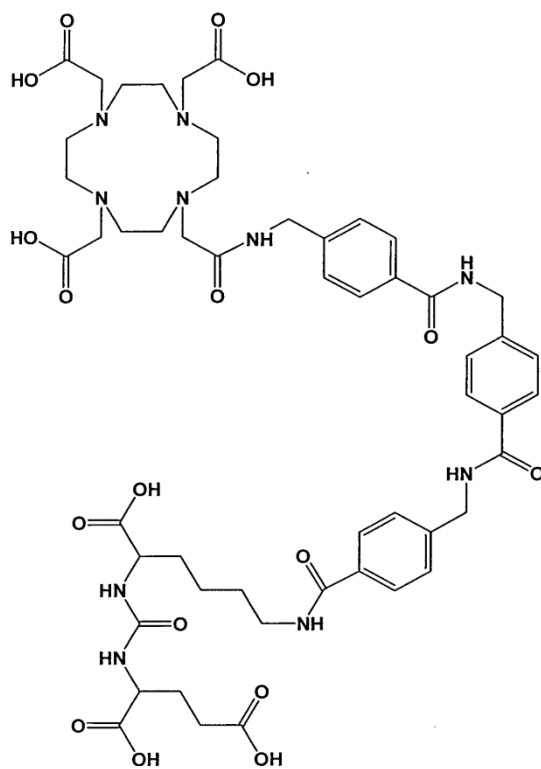


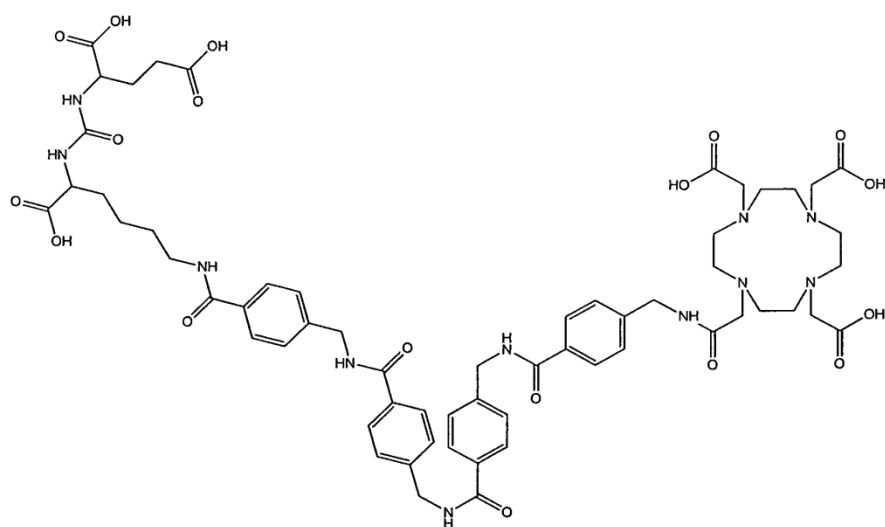
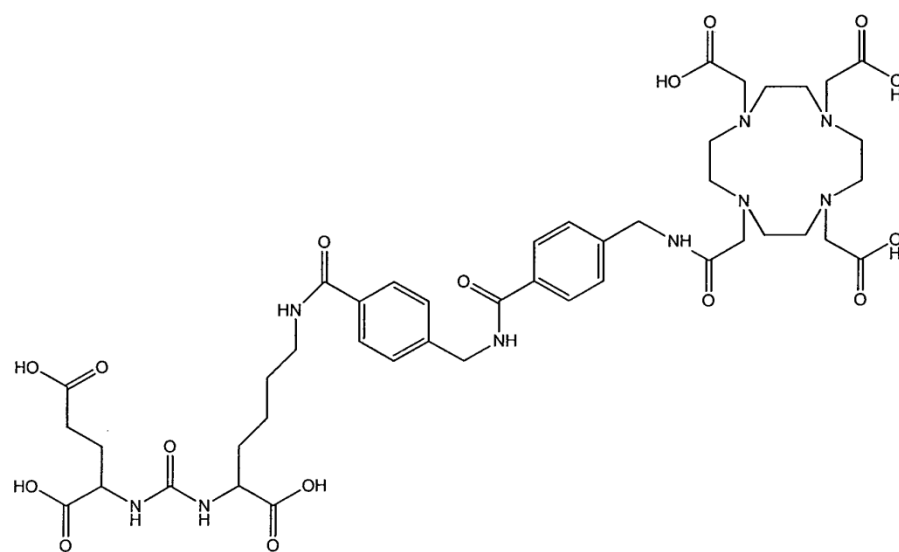
Compuestos preferidos de la presente invención son, p. ej.,



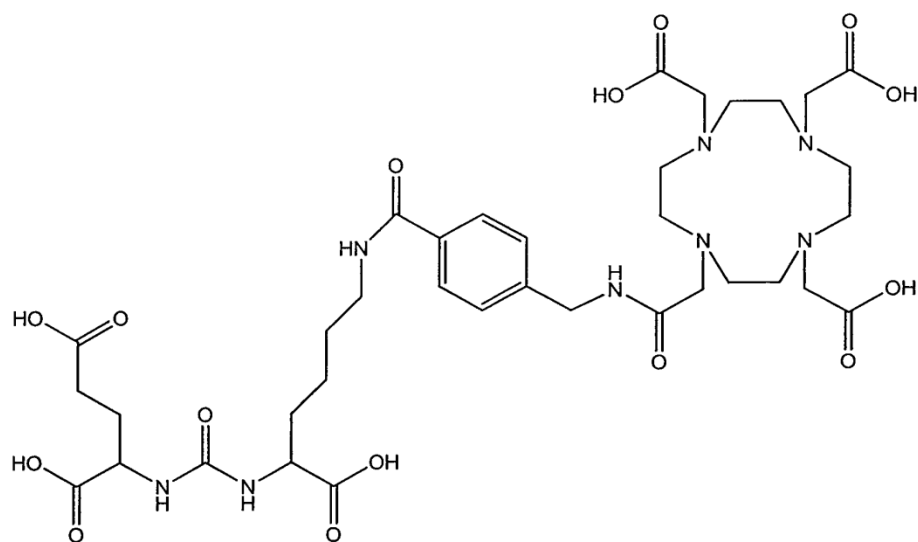
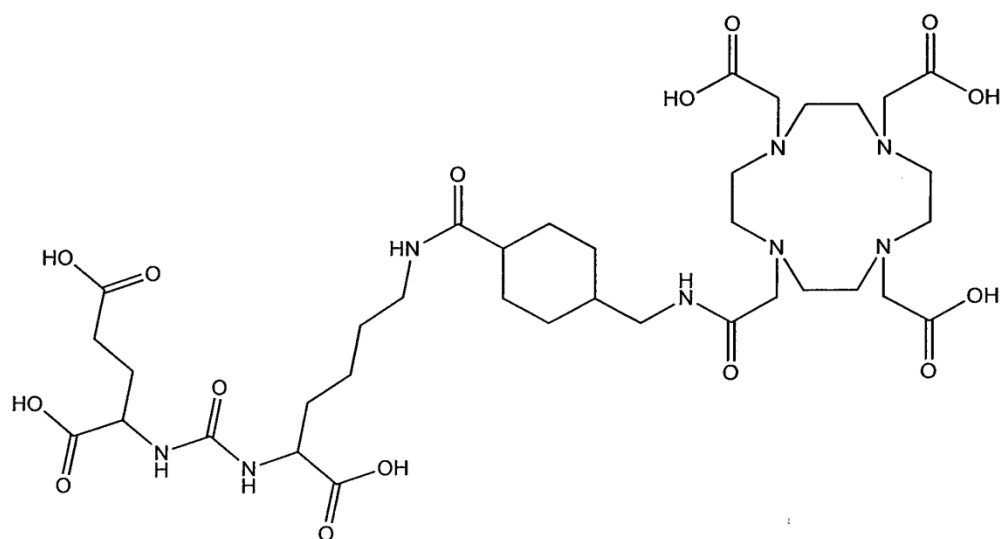
O

- 22 -

**MB17****MB 4**

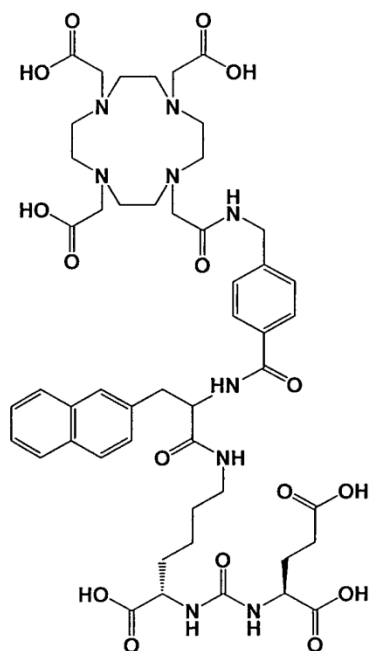
**MB 10****MB 3**

- 24 -

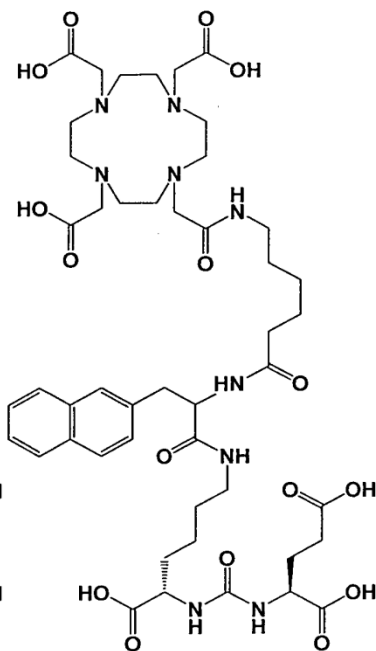
**MB 2****MB 22**

- 25 -

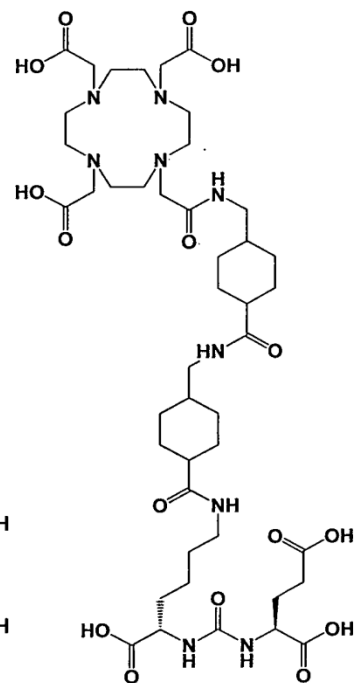
MB24



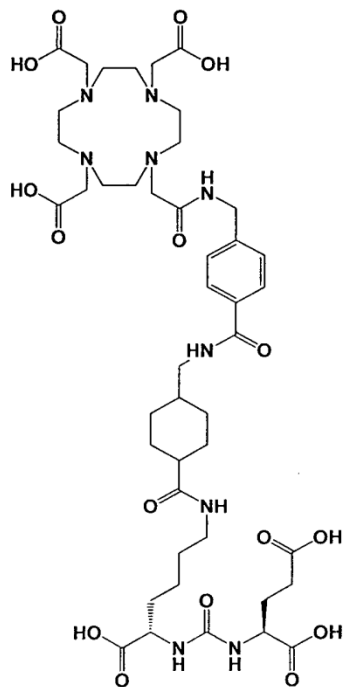
MB25



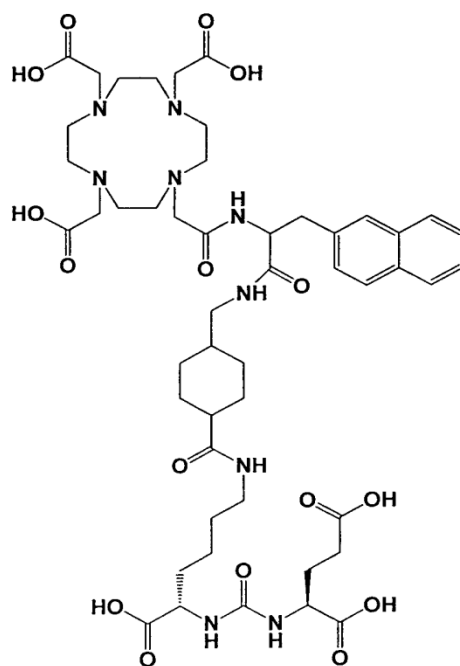
MB31



MB33



MB35



La invención se refiere también a sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula general (Ia) y/o (Ib). La invención se refiere también a solvatos de los compuestos, incluyendo las sales, así como los metabolitos activos de los mismos y, cuando proceda, los tautómeros de los mismos de acuerdo con la fórmula general (Ia) y/o (Ib) incluyendo formulaciones de profármacos.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" es una sal de un ácido orgánico o inorgánico o de una base farmacéuticamente aceptable de un compuesto de la invención. Sales farmacéuticamente aceptables representativas incluyen, p. ej., sales de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos, sales de amonio, sales solubles en agua e insolubles en agua tales como el acetato, carbonato, cloruro, gluconato, glutamato, lactato, laurato, malato o tartrato.

El término "profármaco" se refiere a un precursor de un fármaco que es un compuesto que, tras la administración a un paciente, debe someterse a una conversión química por procesos metabólicos antes de convertirse en un agente farmacológico activo. Profármacos ilustrativos de compuestos de acuerdo con la Fórmula (Ia) y/o (Ib) son ésteres y amidas, preferiblemente ésteres alquílicos de ésteres de ácidos grasos. Formulaciones de profármacos comprenden aquí todas las sustancias que se forman por simple transformación, incluyendo hidrólisis,

- 27 -

oxidación o reducción, o bien por vía enzimática, metabólica o de cualquier otra manera. Un profármaco adecuado contiene, p. ej., una sustancia de fórmula general (Ia) y/o (Ib) unida a través de un enlazador enzimáticamente escindible (p. ej., carbamato, fosfato, N-glicósido o un grupo disulfuro) a una sustancia mejoradora de la disolución (p. ej., tetraetilenglicol, sacáridos, ácido fórmico o ácido glucurónico, etc.). Un profármaco de este tipo de un compuesto de acuerdo con la invención se puede aplicar a un paciente, y este profármaco se puede transformar en una sustancia de fórmula general (Ia) y/o (Ib) con el fin de obtener el efecto farmacológico deseado.

Algunos compuestos de Fórmula (Ia) y/o (Ib) están abarcados en forma de los racematos, sus enantiómeros y opcionalmente en forma de sus diastereoisómeros y todas las mezclas posibles de los mismos.

De acuerdo con la invención, todos los átomos de C quirales tendrán configuración D y/o L; también serán posibles combinaciones dentro de un compuesto, es decir, algunos de los átomos de C quirales pueden tener la configuración D y otros pueden ser de configuración L.

Los compuestos obtenidos pueden estar opcionalmente separados por métodos conocidos (p. ej., *Allinger, N.L. y Elliel E.L. en "Topics in Stereochemistry", Vol. 6, Wiley Interscience, 1971*) en sus enantiómeros y/o diastereómeros. Un

- 28 -

posible método de separación de enantiómeros es el uso de cromatografía.

La invención también se refiere a preparaciones farmacéuticas que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de los ingredientes activos (compuesto de acuerdo con la invención de fórmula (Ia) o (Ib) junto con soportes orgánicos o inorgánicos, sólidos o líquidos, farmacéuticamente aceptables, que son adecuados para la administración prevista y que interactúan con los ingredientes activos sin inconvenientes.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en esta memoria para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del juicio médico, son adecuados para uso en contacto con los tejidos de un paciente sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

Un "paciente" incluye un animal tal como un ser humano, mono, vaca, caballo, gato o perro. El animal puede ser un mamífero tal como un no primate y un primate (p. ej., mono y ser humano). En una realización, un paciente es un ser humano.

En general, el compuesto de Fórmula (Ia) o (Ib) o composiciones farmacéuticas de los mismos, se pueden administrar por vía oral o a través de una vía parenteral, habitualmente mediante inyección o infusión.

- 29 -

Una "vía de administración parenteral" significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, habitualmente por inyección, e incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, inyección e infusión intraespinal e intraesternal.

La dosificación de los compuestos de acuerdo con la invención es determinada por el médico sobre la base de los parámetros específicos del paciente tales como edad, peso, sexo, gravedad de la enfermedad, etc. La dosis es preferiblemente de 0.00001 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de 0.001 a 50 mg/kg de peso corporal, y lo más preferiblemente de 0.01 a 10 mg/kg de peso corporal.

De manera correspondiente al tipo de administración, el medicamento se formula adecuadamente, p. ej., en forma de disoluciones o suspensiones, comprimidos simples o grageas, cápsulas de gelatina duras o blandas, supositorios, óvulos, preparaciones para inyección, que se preparan de acuerdo con métodos galénicos comunes.

Los compuestos de acuerdo con la invención pueden formularse, en caso apropiado, junto con sustancias activas adicionales y con excipientes y soportes comunes en composiciones farmacéuticas, p. ej., - dependiendo de la

- 30 -

preparación a producir - talco, goma arábiga, lactosa, almidón, estearato de magnesio, manteca de cacao, soportes acuosos y no acuosos, cuerpos grasos de origen animal o vegetal, derivados de parafina, glicoles (en particular polietilenglicol), diversos plastificantes, dispersantes o emulsionantes, gases farmacéuticamente compatibles (p. ej., aire, oxígeno, dióxido de carbono, etc.), conservantes.

Con el fin de producir preparaciones líquidas, se pueden utilizar aditivos tales como solución de cloruro sódico, etanol, sorbitol, glicerol, aceite de oliva, aceite de almendras, propilenglicol o etilenglicol.

Cuando se utilizan disoluciones para infusión o inyección, éstas son preferiblemente disoluciones o suspensiones acuosas, siendo posible producirlas antes del uso, p. ej., a partir de preparaciones liofilizadas que contienen la sustancia activa como tal o junto con un soporte tal como manitol, lactosa, glucosa, albúmina y similares. Las disoluciones preparadas se esterilizan y, en caso apropiado, se mezclan con excipientes, p. ej., con conservantes, estabilizantes, emulsionantes, solubilizantes, tampones y/o sales para regular la presión osmótica. La esterilización se puede obtener mediante filtración estéril utilizando filtros que tienen un tamaño de poro pequeño de acuerdo con el cual la composición puede liofilizarse, en caso apropiado. También se pueden añadir pequeñas cantidades de antibióticos para asegurar el

- 31 -

mantenimiento de la esterilidad.

Las frases "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se utilizan en esta memoria, significan la cantidad de un compuesto, material o composición que comprende un compuesto de la invención, u otro ingrediente activo que es eficaz para producir algún efecto terapéutico deseado en al menos una sub-población de células en un animal en una relación beneficio/riesgo razonable, aplicable a cualquier tratamiento médico. Una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a un compuesto de la invención significa la cantidad de agente terapéutico solo, o en combinación con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento de prevención de una enfermedad. Utilizado en unión con un compuesto de la invención, el término puede abarcar una cantidad que mejora la terapia global, reduce o evita síntomas o causas de la enfermedad, o potencia la eficacia terapéutica de o sinergias con otro agente terapéutico.

Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "tratar" o "tratamiento" pretenden abarcar también el diagnóstico, la profilaxis, la prevención, la terapia y la curación.

Los términos, "prevenir", "que previene" y "prevención" se refieren a la prevención del brote, recurrencia o propagación de la enfermedad en un paciente que resulta de la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

Dependiendo de si los compuestos de la Fórmula (Ia) y/o

- 32 -

(Ib) de la invención se han de utilizar como agentes formadores de radio-imágenes o radiofármacos, diferentes radionucleidos forman complejos con el agente quelante. Radionucleidos ilustrativos incluyen, por ejemplo, ^{89}Zr , ^{44}Sc , ^{111}In , ^{90}Y , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{177}Lu , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{149}Tb , ^{152}Tb , ^{155}Tb , ^{161}Tb , ^{153}Gd , ^{155}Gd , ^{157}Gd , ^{213}Bi , ^{225}Ac , ^{230}U , ^{223}Ra , ^{165}Er y Fe. De acuerdo con un aspecto de esta invención, el radionucleido es ^{111}In , ^{90}Y , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{153}Gd , ^{155}Gd , ^{213}Bi , ^{225}Ac , Fe o ^{177}Lu .

Como se señaló anteriormente, complejos de los compuestos de acuerdo con la Fórmula (Ia) o (Ib) pueden contener uno o más radionucleidos que son adecuados para uso como agentes formadores de radioimágenes o como agentes terapéuticos para el tratamiento de células que proliferan rápidamente, por ejemplo, células de cáncer de próstata que expresan PSMA. De acuerdo con la presente invención se les denomina "complejos metálicos" o "radiofármacos".

Métodos de formación de imágenes preferidos son tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT).

Por consiguiente, en una realización, se proporciona una composición farmacéutica que incluye un complejo que incluye un radionucleido y un compuesto de Fórmula (Ia) o de Fórmula (Ib), una sal, solvato, estereoisómero o tautómero del mismo, y un soporte farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona una

- 33 -

composición farmacéutica que es adecuada para la formación de imágenes in vivo y la radioterapia. Composiciones farmacéuticas adecuadas pueden contener un agente formador de radioimágenes, o un agente radioterapéutico que tiene un radionucleido bien como un elemento, es decir, yodo radiactivo, o un complejo de quelato de metal radiactivo del compuesto de Fórmula (Ia) y/o (Ib) en una cantidad suficiente para la formación de imágenes, junto con un vehículo radiológico farmacéuticamente aceptable. El vehículo radiológico debería ser adecuado para la inyección o aspiración, tal como albúmina de suero humana; disoluciones tampón acuosas, p. ej., tris(hidrometil)aminometano (y sus sales), fosfato, citrato, bicarbonato, etc.; agua estéril, solución salina fisiológica; y disoluciones iónicas equilibradas que contienen sales cloruro y/o dicarbonato o precauciones de plasma sanguíneo normales tales como calcio, potasio, sodio y magnesio.

La concentración del agente formador de imágenes o el agente terapéutico en el vehículo radiológico debería ser suficiente para proporcionar una imagen satisfactoria. Por ejemplo, cuando se utiliza una disolución acuosa, la dosis es de aproximadamente 1.0 a 100 milicurios. La dosis real administrada a un paciente para los propósitos de formación de imágenes o terapéuticos, sin embargo, se determina por el tratamiento que administra el médico. El agente formador de imágenes o agente terapéutico debería administrarse con el fin

- 34 -

de permanecer en el paciente durante aproximadamente 1 hora a 10 días, aunque son aceptables períodos de tiempo tanto más largos como más cortos. Por lo tanto, se pueden preparar ampollas convenientes que contengan 1 a 10 mL de disolución acuosa.

La formación de imágenes puede llevarse a cabo de la manera normal, por ejemplo inyectando una cantidad suficiente de la composición formadora de imágenes para proporcionar una formación de imágenes adecuada y luego explorando con una máquina de formación de imágenes o de exploración adecuada tal como un tomógrafo o una cámara gamma. En determinadas realizaciones, un método de formación de imágenes de una región en un paciente incluye las etapas de: (i) administrar a un paciente una cantidad diagnósticamente efectiva de un compuesto complejo con un radionucleido; exponer una región del paciente al dispositivo de exploración; y (ii) obtener una imagen de la región del paciente. En determinadas realizaciones de la región de la que se ha tomado la imagen es la cabeza o el tórax. En otras realizaciones, los compuestos y complejos de Fórmula I(a) y/o (Ib) fijan como objetivo la proteína PSMA.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, se proporciona un método de formar imágenes de tejido tal como tejido del bazo, tejido del riñón o tejido tumoral que expresa PSMA, que incluye poner en contacto el tejido con un complejo sintetizado al poner en contacto un radionucleido y un compuesto de Fórmula

- 35 -

(Ia) y/o Fórmula (Ib).

La cantidad del compuesto de la presente invención, o una formulación que comprende un complejo de un metal y un compuesto de acuerdo con la Fórmula (Ia) y/o (Ib), o su sal, solvato, estereoisómero o tautómero que se administra a un paciente depende de varios factores fisiológicos que se utilizan de forma rutinaria por el médico, incluyendo la naturaleza de la formación de imágenes a llevar a cabo, el tejido a ser fijado como objetivo para la formación de imágenes o la terapia y el peso corporal y el historial médico del paciente del que se han de obtener imágenes o a quien se ha de tratar utilizando un radiofármaco.

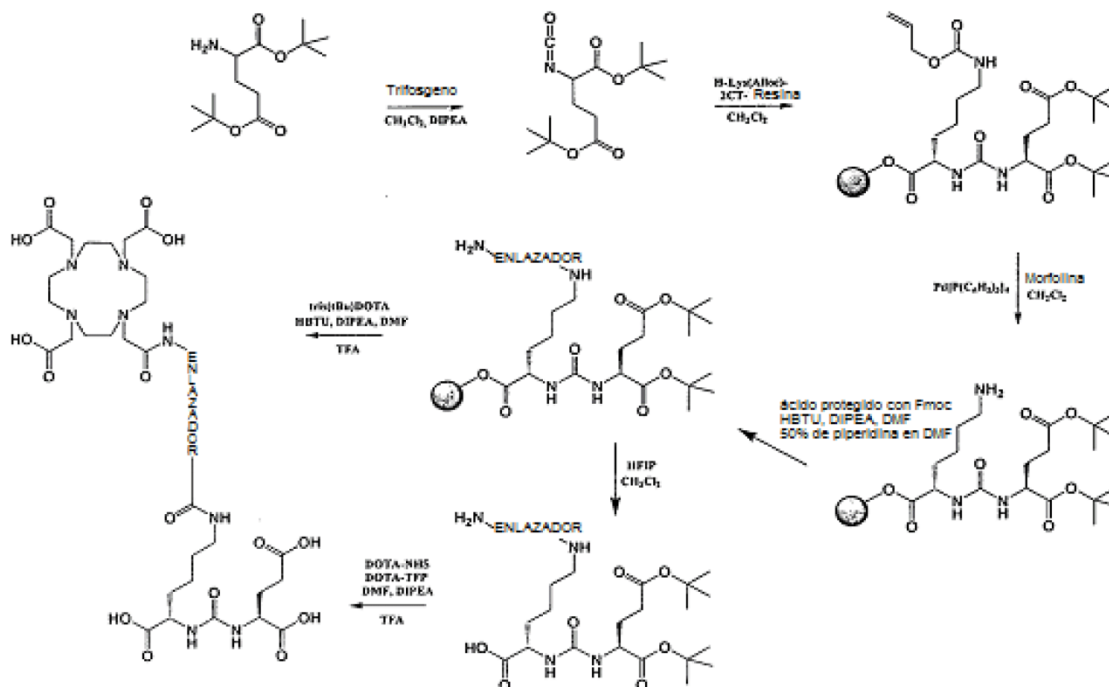
Por consiguiente, en otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar a un paciente mediante la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula (Ia) y/o (Ib) complejoado con un radionucleido, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del complejo para el tratamiento de un paciente que padece una enfermedad o trastorno proliferativo celular. Específicamente, la enfermedad o trastorno proliferativo celular a tratar o a formar imágenes utilizando un compuesto, composición farmacéutica o compuesto radiofarmacéutico de acuerdo con esta invención es un cáncer, por ejemplo, cáncer de próstata y/o metástasis de cáncer de próstata, p. ej., en pulmón, hígado, riñón, huesos, cerebro, médula espinal, vejiga,

- 36 -

etc.

La síntesis de los compuestos de la presente invención se describe en detalle en la sección de ejemplos. Una visión general de la síntesis se ejemplifica en el Esquema 2, relativo a los inhibidores de PSMA conjugado con DOTA. Sin embargo, una persona experta en la técnica sería capaz de modificar las reacciones, p. ej., mediante el uso de otro quelante. Por lo tanto, este esquema no debe entenderse que limite los compuestos de la presente invención sólo al quelante DOTA.

Esquema 2



Los compuestos sintetizados se caracterizan químicamente por RP-HPLC, MS y/o RMN.

Los nuevos agentes formadores de imágenes conjugados con quelantes con modificaciones estructurales en la región de

- 37 -

enlazador tienen propiedades de fijación como objetivo tumores y farmacocinéticas mejoradas. El farmacóforo presenta tres grupos carboxílicos capaces de interactuar con las respectivas cadenas laterales de PSMA y un oxígeno como parte de la formación de complejos de zinc en el centro activo. Además de estas interacciones obligatorias, los autores de la invención fueron capaces de optimizar las interacciones lipofílicas en la región de enlazador.

La evaluación preclínica incluye ensayos *in vitro* (afinidad, internalización) e *in vivo* (exploración μ PET y distribución de órganos).

Los compuestos de la presente invención son mejores que los compuestos de referencia conocidos con respecto al aclaramiento renal y el enriquecimiento en el tumor. La afinidad de unión de los inhibidores de PSMA de la presente invención puede ser influenciada por modificaciones del enlazador. Parecen preferirse dos restos cíclicos y al menos un resto aromático en la región de enlazador de la sustancia y dieron como resultado compuestos MB4 y MB17 de alta afinidad. En este sentido, MB17 es un compuesto muy prometedor.

Por lo tanto, los compuestos de la presente invención representan nuevas sondas que fijan como objetivo PSMA con características óptimas, lo cual también fue confirmado por la distribución de órganos y la formación de imágenes por PET de pequeños animales. Los compuestos de la presente invención

- 38 -

muestran una absorción tumoral alta específica para PSMA. Además, se caracterizan por una acumulación temprana en la vejiga y también una absorción máxima en el riñón. Con respecto al uso terapéutico, esto proporciona ventajas clínicas claras para los compuestos de la presente invención en comparación con otros inhibidores de PSMA. En los diagramas de PET, los compuestos de la presente invención, en particular MB17, muestran un aclaramiento rápido de fondo, así como una reducción sustancial de la acumulación en el riñón después de 2 horas, mientras que se acumula y se retiene adicionalmente en el tumor que expresa PSMA. También, tratamientos *in vivo* con MB17 mostraron por primera vez datos prometedores (véanse las Fig. 17 y 18).

El ejemplo siguiente explica la invención con más detalle, pero no se considera que limite la invención de modo alguno solamente a las formas de realización ejemplificadas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de inhibidores conjugados con DOTA

Los inhibidores de PSMA conjugados con DOTA se sintetizan a través de la síntesis de péptidos en fase sólida (véase el Esquema 2). En una primera etapa, el isocianato del resto glutamilo se generó *in situ* mediante la adición de una mezcla de 3 mmol de bis(terc.-butil)-L-glutamato hidrocloreuro y 3 mL de N-etildiidisopropilamina (DIPEA) en 200 mL de CH₂Cl₂ seco a una disolución de trifosgeno 1 mmol en 10 mL de CH₂Cl₂ seco a

- 39 -

5°C durante 3 h. Después de la reacción, se añadieron 0.5 mmol de una lisina protegida con ϵ -aliloxicarbonilo inmovilizada con resina (2-cloro-tritilresina) y se hizo reaccionar durante 16 h con agitación suave. La resina se separó por filtración y el grupo aliloxi-protector se separó utilizando 50 mg de tetrakis(trifenil)paladio y 400 μ L de morfolina en 4 mL de CH_2Cl_2 durante 2 h.

La síntesis posterior del motivo de unión a PSMA peptidomimético se realizó de acuerdo con el protocolo Fmoc estándar. El siguiente acoplamiento de la parte de enlazador se realizó utilizando 2 mmol del ácido protegido con Fmoc correspondiente, 3.96 mmol de HBTU y 2 mmol de N-etil-diisopropilamina en un volumen final de 4 mL de DMF. Después de la activación con 3.95 eq de HBTU y DIPEA durante 2 h, 4 eq de tris(t-bu)-DOTA (Chematech) con relación a la carga de resina se hicieron reaccionar en un volumen final de 3 mL de DMF. El producto se escindió de la resina en una mezcla de 2 mL que consiste en ácido trifluoroacético, triisopropilsilano y agua (95:2.5:2.5).

El quelante también se conjugó utilizando éster de DOTA-NHS activado con HBTU (CheMatech) o éster de DOTA-TFP (Mier W., Hoffend J., Krämer S., Schuhmacher J., Hull W.E., Eisenhut M., Haberkorn U., *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16:237-240).

El análisis de las moléculas sintetizadas se realizó utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento de fase

- 40 -

inversa (RP-HPLC; Chromolith RP-18e, 100x4.6 mm; Merck, Darmstadt, Alemania) con un gradiente A-B lineal (0% de B a 100% de B en 6 min) a un caudal de 4 mL/min (análisis) o 6 mL/min (purificación). El disolvente A consistía en TFA acuoso al 0.1% y el disolvente B era TFA al 0.1% en CH₃CN. El sistema de HPLC (L6200 A; Merck-Hitachi, Darmstadt, Alemania) estaba equipado con un detector UV y un detector gamma (Bioscan; Washington, EE.UU.). La absorbancia de UV se midió a 214 nm. La espectrometría de masas se realizó con un sistema MALDI-MS Daltonics Microflex (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania).

Ejemplo 2: Radiomarcaje

Típicamente, 1.5 nmol de un compuesto sintetizado del Ejemplo 1 (disuelto en tampón HEPES 0.1 M pH 7.5) se añadió en un volumen de 100 µL a una mezcla de 10 µL de disolución HEPES 2.1 M y 40 µL de eluato de [⁶⁸Ga]Ga³⁺ (40 MBq). El pH de la disolución de marcaje se ajustó a 4.5.

El radiomarcaje de los compuestos resultó en un rendimiento radioquímico de >97% después de 15 minutos a 95°C y se determinó mediante RP-HPLC y TLC. La purificación subsiguiente se realizó utilizando cartuchos Sep-Pak C18.

Ejemplo 3: Síntesis de compuestos MB4 y MB17

El isocianato del resto glutamilo se generó *in situ* mediante la adición de una mezcla de 3 mmol de bis (terc-butil) de L-glutamato hidrocloreuro y 1.5 mL de N-etildiiisopropilamina (DIPEA) en 200 mL de CH₂Cl₂ seco a una disolución de 1 mmol de

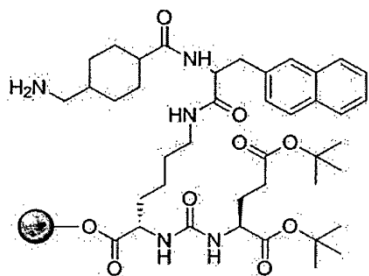
- 41 -

trifosgeno en 10 mL de CH_2Cl_2 seco a 0°C a lo largo de 4 h. Después de agitación de la mezcla de reacción durante 1 h a 25°C , se añadieron 0.5 mmol de la lisina protegida con ϵ -aliloxicarbonilo inmovilizada con resina (2-cloro-tritilresina) en 4 mL de DCM y se hizo reaccionar durante 16 h con agitación suave. La resina se separó por filtración y el grupo aliloxi-protector se separó utilizando 30 mg de tetrakis(trifenil)paladio(0) y 400 μL de morfolina en 4 mL de CH_2Cl_2 durante 3 horas. El siguiente acoplamiento de 3 veces de ácido 4-(Fmoc-aminometil)benzoico (en caso de MB4) o Fmoc-3-(2-naftil)-L-alanina y ácido *trans*-4-(Fmoc-aminometil)ciclohexanocarboxílico (en caso de MB17), respectivamente, se llevó a cabo por etapas utilizando 2 mmol del ácido protegido con Fmoc, 1.96 mmol de HBTU y 2 mmol de *N*-etil-diisopropilamina en un volumen final de 4 mL de DMF. Después de la activación con 3.95 eq de HBTU y DIPEA durante 2 h, 4 eq de tris(*t*-bu)-DOTA (Chematech) con relación a la carga de resina se hicieron reaccionar durante 3 h en un volumen final de 3 mL de DMF. El producto se escindió de la resina en una mezcla de 2 mL que consistía en ácido trifluoroacético, triisopropilsilano y agua (95:2.5:2.5). La purificación se realizó utilizando RP-HPLC y el producto purificado se analizó mediante RP-HPLC analítica y MALDI-MS.

Para la preparación de MB-17D, que es el estereoisómero de MB17(L), la síntesis se basó en Fmoc-3(2-naftil)-D-alanina.

Si no se indica lo contrario, en la presente descripción MB17 significa el estereoisómero L.

Ejemplo 4: Acoplamiento a diversos quelantes



Los quelantes (DOTA, NOTA, NODAGA, DTPA, CHX-DTPA, PCTA, Do3A) se acoplaron al enlazador MB17 mediante síntesis en fase sólida. En general, 13 μmol de resina, que se acopló con el motivo de unión a PSMA se hincharon con DCM en una jeringa con un filtro. Después de lavar la resina 5 veces con DMF, ésta se incubó 2 veces durante 5 min con 20% de piperidina en DMF para desproteger el extremo N. Siguiéron otras 5 veces de lavado con DMF.

Entre 1.5 y 4 equivalentes del quelante (dependiendo del quelante), $0.98 \times n_{\text{quelante}}$ HATU (si es necesario) y 10 equivalentes de DIPEA se disolvieron en 500 μl de DMF, la disolución se aspiró en la jeringa que contenía la resina y se incubó durante una noche. A continuación, la resina se lavó 5 veces en cada caso con DMF, metanol, DCM y dietil-éter y se secó en vacío.

Para comprobar el estado de la reacción, se utilizaron las separaciones de prueba. Esto se logró mediante el lavado

- 43 -

de una pequeña cantidad de resina con DCM en una punta del filtro y añadiendo 100 µl de disolución de separación que contiene 95% de TFA, 2.5% de agua y 2.5% de TIPS. Después de 30 min de incubación, la disolución se pipeteó en dietil-éter enfriado con hielo y se centrifugó. El dietil-éter se decantó y el sedimento restante se disolvió en 35 µl de ACN:H₂O (1:1) y se analizó mediante HPLC (0-100% de ACN en agua en el espacio de 5 min) y LC/MS.

Si se obtuvo el producto deseado, el péptido completo se separó de la resina. La resina seca se incubó con 500 µl de la disolución de separación (95% de TFA, 2.5% de H₂O, 2.5% de TIPS) durante 2 horas. La disolución resultante se mezcló con dietil-éter enfriado con hielo y se centrifugó (4000 min⁻¹, 5 min). El sobrenadante se desechó, se añadió nuevo dietil-éter y el receptáculo se agitó vigorosamente para resuspender el sedimento. Una vez más, la disolución se centrifugó (4000 min⁻¹, 5 min) y el sobrenadante resultante se desechó. El sedimento se secó luego en vacío y finalmente se resuspendió en 1 ml de ACN:H₂O (1:1).

La purificación se consiguió mediante HPLC preparativa, los picos se analizaron mediante HPLC analítica (0-100% de ACN en agua en el espacio de 5 min) y LC/MS y los que contienen el producto se reunieron y liofilizaron.

Ejemplo 5: Radiomarcaje

Marcaje con ¹⁷⁷Lu

- 44 -

^{177}Lu (aprox. 100 MBq) se mezcló con 200 μl de tampón acetato de sodio 0.4 M que contenía Chelex ($\text{pH} = 5$). 10 μl de una disolución 1 mM del compuesto en DMSO al 10% en agua, 2 μl de una disolución saturada de ácido ascórbico y 40 μl de la disolución que contiene ^{177}Lu se mezclaron y se calentaron a 95°C durante 10 min. El marcaje se verificó mediante radio-HPLC (0-100% de ACN en agua en el espacio de 5 min, columna Monolith).

Marcaje con ^{68}Ga

Para la exploración por PET, CHX-DTPA se marcó con ^{68}Ga . 1 ml de ^{68}Ga se eluyó de un generador de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ con HCl 0.6 M. Se añadieron 298 μl de tampón NaOAc y 1 μl de una disolución 10 mM de CHX-DTPA en DMSO y se incubó durante 5 min. Después, el producto se purificó utilizando un cartucho SOLA. El lavado se realizó con una disolución de NaCl al 0.9% y para la elución se utilizó etanol. El etanol se vaporizó después y el producto remanente se disolvió en 100 μl de una disolución de NaCl al 0.9% y 10 μl de tampón fosfato.

Ejemplo 6: Determinación del valor CI_{50}

Una placa de filtro MultiScreen_{HTS}-DV se incubó a temperatura ambiente con 100 μl de PBS con BSA al 1% por pocillo durante 30 min. Después de retirar la disolución de PBS/BSA 10^5 células LNCaP en 50 μl de Opti-MEM se aplicaron a cada uno de los pocillos. Diferentes concentraciones de los compuestos (que conducen a concentraciones de 0. 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50,

- 45 -

100, 500, 1000 y 5000 nM en cada uno de los pocillos) en 300 μ l de Opti-MEM se mezclaron con 3 μ l de una disolución 150 nM de MIP-1466 marcada con ^{125} I en Opti-MEM. Se añadieron 50 μ L de la disolución resultante a cada uno de los pocillos, cada una de las concentraciones se pipeteó por cuadruplicado. Cada uno de los pocillos contenía ahora el ligando marcado radiactivamente en una concentración de 0.75 nM y el ligando competitivo, no marcado en la concentración mencionada anteriormente. La placa se incubó durante 45 min a temperatura ambiente en un agitador.

Después de la incubación, las células se lavaron 2 veces con 100 μ l de PBS enfriada con hielo y 1 vez con 200 μ l de PBS enfriada con hielo. Finalmente, se recogieron los filtros y la radiactividad restante se midió con un contador gamma. Cada uno de los tubos se midió durante 5 min.

Los datos medidos por el contador gamma fueron evaluados con Graphpad Prism para conseguir una concentración de inhibición 50 (CI₅₀) frente a MIP-1095 marcado radiactivamente.

Conjugado	CI ₅₀ [nM]
MB17-DOTA	0.13 $\pm$ 0.08
MB17-NOTA	0.14 $\pm$ 0.08
MB17-DTPA	0.12 $\pm$ 0.05
MB17-CHX-DTPA	0.06 $\pm$ 0.04
MB17-PCTA	0.10 $\pm$ 0.06
MB17-DO3A	0.10 $\pm$ 0.05

MB17-NODAGA	0.09 ± 0.08
-------------	-------------

Ejemplo 7: μ PET - formación de imágenes utilizando CHX-DTPA-MB17

Antes de la inyección en el ratón, la disolución que contenía el inhibidor de PSMA acoplado a ^{68}Ga -CHX-DTPA purificada fue filtrada con condiciones estériles. 100 μl de esta disolución se recogieron en una jeringa y luego se inyectaron en un ratón BALB/c inmunológicamente deficiente xenoinjerto LNCaP, por vía intravenosa en la vena de la cola. La exploración por PET se registró durante 140 min con un aparato Siemens Inveon PET (Fig. 15)

Ejemplo 8: Determinación de la afinidad de unión competitiva

Con el fin de comparar la serie de nuevos compuestos, se analizó la afinidad de unión competitiva y la internalización específica utilizando la línea celular que expresa PSMA LNCaP. Para determinar la absorción celular específica, las células se bloquearon con ácido 2-(fosfonometil)-pentanodioico (PMPA). La potencia de inhibición también se investigó mediante el ensayo de NAALADasa basado en enzimas.

Cultivo celular

Para los estudios de unión y los experimentos in vivo, células LNCaP (lesión metastásica de adenocarcinoma prostático humano, ATCC CRL-1740) se cultivaron en medio RPMI suplementado con suero de ternero fetal al 10% y Glutamax (PAA, Austria). Durante el cultivo celular, las células fueron cultivadas a 37

- 47 -

°C en una incubadora con aire humidificado, equilibrada con 5% de CO₂. Las células se recogieron utilizando tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (tripsina-EDTA; tripsina al 0.25%, EDTA al 0.02%, todos de PAA, Austria) y se lavaron con PBS.

Unión celular e internalización

El ensayo de unión celular competitivo y los experimentos de internalización se realizaron como se describió previamente (Eder et al. 2012). En síntesis, las células respectivas (10⁵ por pocillo) se incubaron con el radioligando ([Glu-urea-Lys(Ahx)]2-HBED-CC marcado con 68Ga (Schafer et al., 2012) en presencia de 12 concentraciones diferentes de analito (0-5000 nM, 100 µL/pocillo). Después de la incubación, el lavado se llevó a cabo utilizando un colector de vacío de multipantalla (Millipore, Billerica, MA). La radiactividad unida a la célula se midió utilizando un contador gamma (Packard Cobra II, GMI, Minnesota, EE.UU.). La concentración inhibitoria al 50% (CI50) se calculó ajustando los datos utilizando un algoritmo de regresión no lineal (GraphPad Software). Los experimentos se realizaron tres veces.

Para determinar la absorción celular específica y la internalización, 10⁵ células fueron sembradas en placas de cultivo celular de 24 pocillos recubiertas con poli-L-lisina 24 h antes de la incubación. Después del lavado, las células fueron incubadas con 25 nM de los compuestos radiomarcados durante 45 min a 37°C y a 4°C, respectivamente. La absorción

- 48 -

celular específica se determinó mediante bloqueo competitivo con ácido 2-(fosfonometil)pentanodioico (concentración final de 500 μ M, PMPA, Axxora, Loerrach, Alemania). La absorción celular se terminó lavando 4 veces con 1 mL de PBS enfriado con hielo. Las células se incubaron posteriormente dos veces con 0.5 mL de glicina-HCl en PBS (50 mM, pH = 2.8) durante 5 min para separar la fracción unida a la superficie. Las células se lavaron con 1 mL de PBS enfriado con hielo y se lisaron utilizando NaOH 0.3 N (0.5 mL). Las fracciones unidas a la superficie y las interiorizadas se midieron en un contador gamma. La absorción celular se calculó como porcentaje de la radiactividad añadida inicialmente unida a 10^6 células [% ID/ 10^6 células].

Ensayo de NAALADasa

PSMA humano recombinante (rhPSMA, R&D Systems, Wiesbaden, Alemania) se diluyó en tampón de ensayo (HEPES 50 mM, NaCl 0.1 M, pH 7.5) a 0.4 μ g/mL. El sustrato Ac-Asp-Glu (Sigma, Taufkirchen, Alemania, concentración final 40 μ M) se mezcló con analito marcado con natGa a concentraciones comprendidas entre 0.05 nM y 1000 nM en un volumen final de 125 μ L de tampón de ensayo. Las mezclas se combinaron con 125 μ L de la disolución de rhPSMA (0.4 μ g/mL) y se incubaron durante una hora a 37°C. La reacción se detuvo mediante calentamiento a 95°C durante 5 minutos. Se añadieron 250 μ L de una disolución 15 mM de ortoftaldialdehído (Sigma, Taufkirchen, Alemania) a todos los

- 49 -

viales y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, 200 µL de las disoluciones de reacción se cargaron en una placa F16 Black Maxisorp (Nunc, Langenselbold, Alemania) y se leyó a longitudes de onda de excitación y de emisión de 330 nm y 450 nm, respectivamente, utilizando un lector de microplacas (DTX-880, Beckman Coulter, Krefeld, Alemania). Los datos se analizaron mediante un algoritmo de regresión de unión-total del sitio uno de GraphPad (GraphPad Software, California, EE.UU.).

Biodistribución

Ratones BALB/c nu/nu machos, de 7 a 8 semanas de edad, (Charles River Laboratories) fueron inoculados por vía subcutánea en el tronco derecho con 5×10^6 células de LNCaP (en Matrigel al 50%; Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania). Los tumores se dejaron crecer hasta un tamaño de aproximadamente 1 cm³. Los compuestos radiomarcados se inyectaron en la vena de la cola (aprox. 1 MBq por ratón; 0.06 nmol). 1 h después de la inyección, los animales fueron sacrificados. Órganos de interés se diseccionaron, secaron y pesaron. La radiactividad se midió utilizando un contador gamma y se calculó como % ID/g.

MicroPET

Para los estudios de microPET, 10 - 25 MBq de los compuestos radiomarcados en un volumen de 0.15 ml (~ 0.5 nmol) se inyectaron a través de una vena lateral de la cola en ratones

portadores de xenoinjertos de tumores LNCaP. Los animales anestesiados (sevoflurano al 2%, Abbott, Wiesbaden, Alemania) se colocaron en posición boca abajo en el escáner PET de animales pequeños Inveon (Siemens, Knoxville, Tenn, EE.UU.) para realizar exploraciones por microPET dinámicas y exploraciones estáticas durante 20 min; véanse las Figs. 1, 3, 5-14.

Tabla A

Sustancia	CI_{50} [nM]	Internalización [%IA/ 10^6 células]
MB2	2.75±0.82	8.78±3.96 para Ga-68 5.22±0.67 para Lu-177
MB3	10.51±6.06	3.65±1.32 para Lu-177
MB4	0.74±0.50	14.18±0.98 para Ga-68 14.25±4.61 para Lu-177
MB10	8.67±1.58	6.96±3.90 para Lu-177
MB17	0.13±0.08	17.02±4.36 para Ga-68 17.51±3.99 para Lu-177
MB17.D	12.41±5.10	2.60±0.14 para Lu-177
MB22	52.80	1.15±0.19 para Lu-177
MB24	3.33	7.26±2.76 para Lu-177
MB25	6.64	3.91±0.54 para Lu-177
MB31	91.80	0.53±0.48 para Lu-177
MB33	59.33	1.96±0.20 para Lu-177

MB35	26.18	0.97±0.17 para Lu-177
-------------	-------	------------------------------

El presente ejemplo demuestra que la afinidad de unión de los inhibidores de PSMA puede ser influenciada por modificaciones del enlazador. Parecen ser preferibles dos restos cíclicos y al menos un resto aromático en la región del enlazador de la sustancia y dieron como resultado compuestos MB4 y MB17 de alta afinidad. Estas nuevas variantes muestran una baja afinidad nanomolar por la línea celular LNCaP y fueron internalizadas específicamente a 37 °C hasta un 48% ID/10⁶ células. Estudios anteriores demostraron que, además de la afinidad de unión, las propiedades de internalización de sondas que fijan como objetivo PSMA son tasas muy importantes y de alta internalización, esenciales para alta absorción y retención del tumor in vivo. Por lo tanto, MB17 representa una nueva sonda que fija como objetivo PSMA con características óptimas, lo cual también fue confirmado por la distribución en órganos y la formación de imágenes por PET de animales pequeños. MB17 muestra una elevada absorción del tumor específica para PSMA (Fig. 2). Además, la formación dinámica de imágenes por PET de MB17 (Fig. 2) muestra una acumulación temprana en la vejiga y también la absorción renal máxima (punto más alto en la curva tiempo-actividad) se produce tan pronto como 15 min después de la inyección del radiotrazador y disminuye sustancialmente ya después de 20 minutos. Con respecto al uso terapéutico, esto da claras ventajas clínicas

para MB17 en comparación con otros inhibidores de PSMA. En los diagramas de PET (Fig. 1) MB17 muestra un aclaramiento rápido de fondo, así como una reducción sustancial de la acumulación en el riñón después de 2 horas mientras que se acumula adicionalmente y queda retenida en el tumor que expresa PSMA.

Además, la distribución de órganos con ^{177}Lu (Fig. 4) mostró que la alta absorción renal inicial está casi eliminada por lavado por completo ($2.13 \pm 1.36\%$ ID/g) después de 24 horas, mientras que la absorción tumoral se mantuvo alta e incluso aumentó ($10.58 \pm 4.50\%$ ID/g). Otros órganos tales como el hígado ($0.08 \pm 0.03\%$ ID/g), pulmón ($0.11 \pm 0.13\%$ ID/g) y bazo ($0.13 \pm 0.05\%$ ID/g) mostraron una absorción muy baja. La farmacocinética favorable condujeron a relaciones extremadamente altas de tumor-a-fondo (Tumor/Blood: 1058; Tumor/Muscle: 529) después de 24 horas la Tabla A confirma claramente que las modificaciones químicas en la región de enlazador de la molécula afectan a las propiedades biológicas, p. ej., afinidad y eficacia de internalización. MB17 y MB4 muestran las propiedades de unión más prometedores en las células.

Ejemplo 9: Datos Clínicos relativos a MB17

La formación de imágenes por PET/CT se realizó utilizando el radiotrazador MB17 marcado con Ga-68 (véase la Fig. 17)

El generador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ utilizado para la producción de radiofármacos se adquirió de IDB-Holland BV (Baarle-Nassau,

- 53 -

Países Bajos). Kits de casete desechable y productos químicos que incluyen el precursor de calidad compatible con GMP utilizado para la radiosíntesis fueron obtenidos de ABX advanced biochemical compounds (Radeberg, Alemania). Un sistema Ultimate 3000 HPLC (Dionex) (acetonitrilo (A), agua + TFA al 0.1% (B); gradiente: 0.5 min 95% de B, 10.0 min 80% de A, caudal: 2 mL/min) equipado con una columna Chromolith Performance RP-18e (100 x 4.6 mm, Merck) y un radiodetector NaI (Raytest) se utilizó para determinar la pureza radioquímica. Disolventes residuales se determinaron utilizando un cromatógrafo de gases de la Serie 6850 (Agilent Technologies). El ensayo de endotoxina se realizó con un dispositivo Endosafe®-PTS (Charles River).

2 µg de MB17 se disolvieron en tampón acetato 1.5 M pH 4.5 (1 mL) y ácido ascórbico 1 M (10 µL) y se transfirieron al recipiente de reacción. El generador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ se eluyó con 10 mL de HCl 0.6 M y el eluato se diluyó con 9 mL de agua ultrapura. A continuación, la mezcla se transfirió a un cartucho de intercambio de cationes (Macherey-Nagel PS-H+, tamaño M) y se eluyó con disolución de NaCl 5 M (1.2 mL) en el recipiente de reacción precalentado (100°C). La mezcla de reacción se calentó durante 10 minutos. Después, la mezcla de reacción bruta se retiró del recipiente de reacción y se transfirió a un cartucho C18 preacondicionado (10 mL de EtOH/10 mL de agua ultrapura) (Waters Sep-Pak light). 9 mL de agua ultrapura se utilizaron

- 54 -

para aclarar el recipiente de reacción y se hicieron pasar al cartucho C18. El cartucho C18 se lavó con otros 5 mL de agua ultrapura. El producto final se eluyó del cartucho C18 con 2 mL de EtOH/H₂O (v:v 1:1), se filtró en condiciones estériles (Millipore Cathivex-GV, 0.22 µm) y se diluyó con 10 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7.4 (de acuerdo con la Farmacopea Europea 8.0 (4005000)). La disolución de complejo de ⁶⁸Ga-MB17 se aplicó a los pacientes a través de un bolo intravenoso.

Ejemplo 10: Terapia humana con MB17 marcado con ¹⁷⁷Lu

Para la terapia, el ligando MB17 de PSMA se marcó radiactivamente con Lu-177. ¹⁷⁷LuCl₃ se obtuvo de Perkin Elmer (4 GBq, NEZ307D, HCl 0.04 M). 80 nmol de MB17 se disolvieron en 400 µL de tampón acetato de sodio (0.4 M, pH 5) suplementado con 5 µL de ácido ascórbico al 20%. La disolución se transfirió a ¹⁷⁷LuCl₃ y se incubó durante 10 minutos a 95°C. Finalmente, se añadieron 2 mL de NaCl al 0.9%. Para el control de calidad, se realizaron ITLC y radio-HPLC.

El MB17 marcado con ¹⁷⁷Lu se aplicó a los pacientes a través de un bolo intravenoso (5 mL, lentamente en el espacio de 30 segundos). La aplicación por vía intravenosa fue acompañada por una infusión de NaCl al 0.9% durante 4.5 h a partir de 0.5 h antes de la inyección. Se hace referencia a la Fig. 18.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método

- 55 -

conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.