

INHIBIDORES MARCADOS CON ¹⁸F MEJORADOS DEL ANTÍGENO DE MEMBRANA ESPECÍFICA DE PRÓSTATA (PSMA) Y SU USO COMO AGENTES DE FORMACIÓN DE IMÁGENES PARA CÁNCER DE PRÓSTATA

5

La presente invención generalmente se refiere al campo de los radiofármacos y a su uso en medicina nuclear como trazadores y agentes de formación de imágenes para los diversos estados de enfermedad del cáncer de próstata.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer de próstata (PcA) es el principal cáncer en la población US y Europa. Al menos 1-2 millones de hombres en el hemisferio occidental sufren de cáncer de próstata y se estima que la enfermedad afectará a uno de cada seis hombres entre las edades de 55 y 85. Hay más de 300.000 nuevos casos de cáncer de próstata diagnosticados cada año en USA. La mortalidad por la enfermedad solo es superada por el cáncer de pulmón. Actualmente, los métodos anatómicos, tales como la tomografía computada (CT), resonancia magnética (MR) y ultrasonido, predominan para la obtención de imágenes clínicas del cáncer de próstata. Se estima que actualmente se gastan \$ 2 mil millones en todo el mundo en cirugía, radiación, terapias farmacológicas y tratamientos mínimamente invasivos. Sin embargo, actualmente no existe una terapia efectiva para el cáncer de próstata recidivante, metastásico e independiente de andrógenos.

Una variedad de agentes de formación de imágenes PCa de peso molecular bajo experimental se están investigando clínicamente, incluyendo los análogos de colina radiomarcados ([¹¹C]Colina, [¹⁸F]FECh, [¹⁸F] FMC, [¹⁸F]fluorodihidrotestosterona ([¹⁸F]FDHT), ácido anti-1-amino-3-[¹⁸F]fluorociclobutil-1-carboxílico (anti[¹⁸F]F-FACBC, [¹¹C]acetato y 1-(2-deoxi-2-[¹⁸F]fluoro-L-arabinofuranosil)-5-metiluracilo (-[¹⁸F]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 ciertas ventajas, por ejemplo, baja excreción urinaria de [¹¹C]colina, y desventajas, tales como la vida media física corta 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 las células tumorales ofrece la oportunidad de diagnosticar y caracterizar la enfermedad mediante el análisis de la identidad fenotípica y la composición bioquímica y la actividad del tumor. Las moléculas radiactivas que se unen selectivamente a proteínas de la superficie de células tumorales específicas proporcionan una ruta atractiva para obtener imágenes y tratar tumores en condiciones no invasivas. Una nueva serie prometedora de agentes de formación de imágenes de bajo peso molecular se dirige al antígeno de membrana específico de la próstata (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; WO 2013/022797).

El PSMA es una glucoproteína de tipo II de transmembrana de 750 aminoácidos que tiene una expresión abundante y restringida en la superficie de PCa, particularmente en la enfermedad avanzada y metastásica independiente de andrógenos (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 son independientes de andrógenos a lo largo del tiempo. El PSMA posee los criterios de un objetivo prometedor para la terapia, es decir, expresión abundante y restringida (en próstata) en todas las etapas de la enfermedad, presentación en la superficie celular pero no liberado a la circulación y asociación con actividad enzimática o de señalización (Schulke, N et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 12590-12595). El gen PSMA se localiza en el brazo corto del cromosoma 11 y funciona como folato hidrolasa y neuropeptidasa. Tiene una función neuropeptidasa que es equivalente a glutamato carboxipeptidasa II (GCP II), que se denomina como

"PSMA cerebral", y puede modular la transmisión glutamatérgica mediante la escisión del N-acetilaspartilglutamato (NAAG) a N-acetilaspartato (NAA) y glutamato (Nan, F.; et al. *J Med Chem* 2000, 43, 772-774). Hay hasta 10^6 moléculas de PSMA por célula cancerosa, lo que sugiere a esta como un objetivo ideal para la formación de imágenes y la terapia con técnicas basadas en radionúclidos (Tasch, J.; et al. *Crit Rev Immunol* 2001, 21, 249-261).

El radioinmunoconjugado del anticuerpo monoclonal anti-PSMA (mAb) 7E11, conocido como el escáner PROSTASCINT®, se usa actualmente para diagnosticar la metástasis y recidiva del cáncer de próstata. Sin embargo, este agente tiende a producir imágenes que son difíciles de interpretar (Lange, P.H. PROSTASCINT scan for staging cáncer de próstata. *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 se han radiomarcado y demostrado que se acumulan en modelos de tumores de próstata positivos para PSMA en animales. Sin embargo, el diagnóstico y la detección de tumores usando anticuerpos monoclonales han sido limitados por la baja permeabilidad del anticuerpo monoclonal en tumores sólidos.

El direccionamiento selectivo de células cancerosas con radiofármacos para fines de exámenes de imágenes o terapéuticos es un desafío. Se sabe que una variedad de radionúclidos son útiles para radiología o radioterapia contra el cáncer, que incluyen ^{11}C , ^{18}F , ^{111}In , ^{90}Y , ^{68}Ga , ^{177}Lu , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I y ^{131}I . Recientemente se ha demostrado que algunos compuestos que contienen un glutamato-urea-glutamato (GUG) o un elemento de reconocimiento de glutamato-urea-lisina (GUL) unido a un conjugado de radionúclido-ligando muestran una alta afinidad por PSMA.

Varios compuestos marcados con ^{18}F que muestran interacción de PSMA y son adecuados para la detección de cáncer de próstata se muestran en el documento EP 14 003 570.0. Sin embargo, estos compuestos muestran altas propiedades lipofílicas, las que los vuelven, hasta cierto punto, difíciles de manipular y administrar.

Se necesitan nuevos agentes que permitan la visualización rápida de cáncer de próstata. Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es desarrollar ligandos que

interactúen con PSMA y transporten radionúclidos apropiados, que proporcionen una opción de direccionamiento nueva y prometedora para la detección, tratamiento y manejo del cáncer de próstata.

5 SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

La solución de dicho objetivo se logra proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

- 10 Los inventores hallaron nuevos compuestos que son radiofármacos útiles y su uso en medicina nuclear como marcadores y agentes de formación de imágenes y para diversos estados de enfermedad del cáncer de próstata.

Los nuevos agentes de formación de imágenes con modificaciones estructurales en la
15 región del ligador han mejorado las propiedades de direccionamiento al tumor y la farmacocinética. El farmacóforo presenta tres grupos carboxílicos capaces de interactuar con las cadenas laterales respectivas de PSMA y un oxígeno como parte de la complejación de zinc en el centro activo. Además de estas interacciones obligatorias, los inventores fueron capaces de optimizar las interacciones lipofílicas en la región del
20 ligador en comparación con los compuestos descritos en el documento EP 14003570.0. Además, los inventores añadieron algunos bloques de construcción hidrofílicos al ligador para una mejora de la farmacocinética.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 25 Fig. 1: ^{18}F -Marcación de macromoléculas
Fig. 2: ^{18}F -Fluoración por medio de grupos prostéticos
Fig. 3: ^{18}F -Grupos prostéticos para péptidos
Fig. 4: ^{18}F -Grupos prostéticos marcados usando "Química clic"
Fig. 5: Formación de [^{18}F]ariltrifluoroboronatos y sensores de fluoruro
30 Fig. 6: Complejos de ^{18}F -Fluoruros
Fig. 7: ^{18}F -Marcación de péptidos RGD

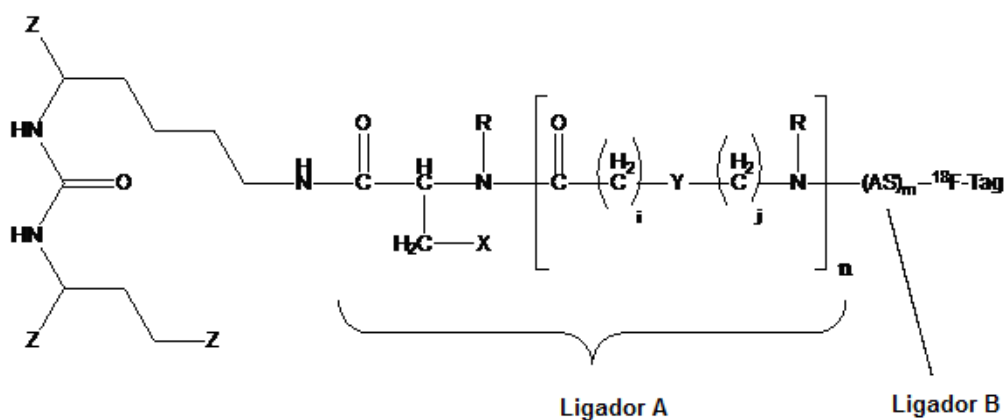
- Fig. 8: Distribución en órganos de [^{18}F]PSMA-1007 en ratones LNCaP PSMA-positivo (normal y bloqueado) y en ratones PC3 PSMA negativos versus [^{18}F]PSMA-1009 ([^{18}F]DCFPil) en ratones LNCaP PSMA-positivo
- Fig. 9: Distribución en órganos de [^{18}F]PSMA-1007 en ratones LNCaP PSMA-positivo (no bloqueado y bloqueado versus [^{18}F]PSMA1003 en ratones LNCaP PSMA-positivo (no bloqueado)
- Fig. 10: MIP de [^{18}F]PSMA-1007 en un ratón LNCaP PSMA-positivo 120-140 min p.i.
- Fig. 11: Curva de tiempo-actividad de [^{18}F]PSMA-1007 en un ratón LNCaP PSMA-positivo, que incluye los valores de SUV 120-140 min p.i.
- Fig. 12: Estructura de PSMA-1003
- Fig. 13: Estructura de PSMA-1009
- Fig.14: MIP de [^{18}F]PSMA-1007 en un voluntario sano
- Fig.15: Curvas de tiempo-actividad de sangre (negro) y suero (gris) expresadas como por ciento de dosis inyectada en un voluntario sano
- Fig.16: Curvas de tiempo-actividad de órganos normales con volumen de interés delineable PET en un voluntario sano
- Fig. 17: Distribución en órganos [^{18}F]PSMA-1007 en diez pacientes que padecen de cáncer de próstata expresado como SUV_{max}
- Fig. 18: Relaciones de tumor a fondo de [^{18}F]PSMA-1007 en diez pacientes que padecen de cáncer de próstata calculada de los valores de SUV_{max} respectivos
- Fig. 19: MIP de un paciente de cáncer de próstata de 77 años (PSA 40 ng/ml) escaneado con [^{18}F] PSMA-1007 1 y 3 h p.i. que muestra una masa tumoral grande en el área media y ápice de la próstata y varias metástasis a los ganglios linfáticos. Fuera de la región pélvica no se encontraron metástasis
- Fig. 20: MIP de un paciente de 72 años (PSA 15 ng/ml) diagnosticado con cáncer de próstata Gleason 9 (5 + 4) escaneado con [^{18}F]PSMA-1007 1 y 3 h pi. El paciente presenta una gran masa tumoral en la glándula prostática completa con infiltración en las vesículas seminales izquierdas y varios ganglios linfáticos en la región pélvica. Dos ganglios linfáticos metastásicos se localizan fuera de la región pélvica, ambos paraaórticos en el nivel L3/4 y L5.
- Fig. 21: Escaneado PET/CT transaxial (a, b) e histopatología correspondiente de la muestra de prostatectomía posterior; tinción H & E (c); Inmunotinción de PSMA con contornos tumorales delimitados circunscritos por la línea discontinua (d).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a radiofármacos y su uso en medicina nuclear como trazadores y agentes de formación de imágenes para los diversos estados de enfermedad del cáncer de próstata.

- 5 En consecuencia, la presente invención se refiere a compuestos que están representados por la Fórmula general I

1.

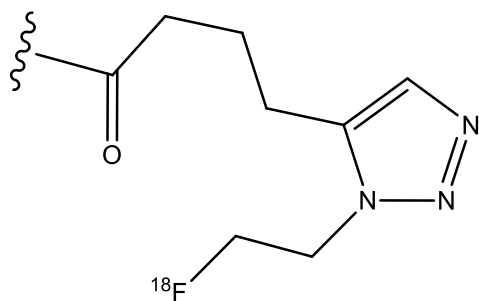
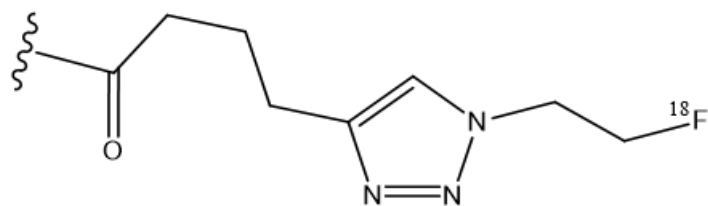
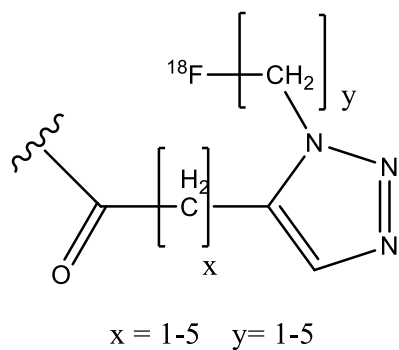
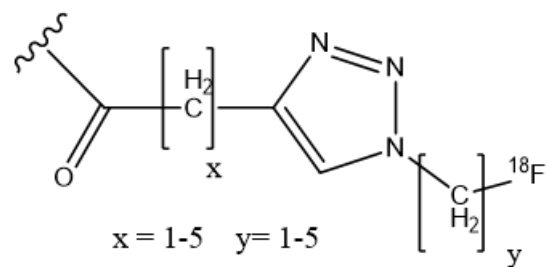
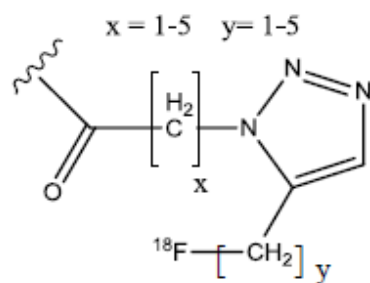
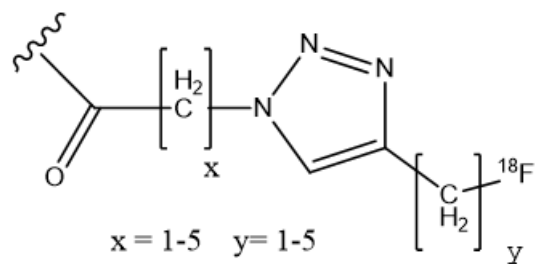


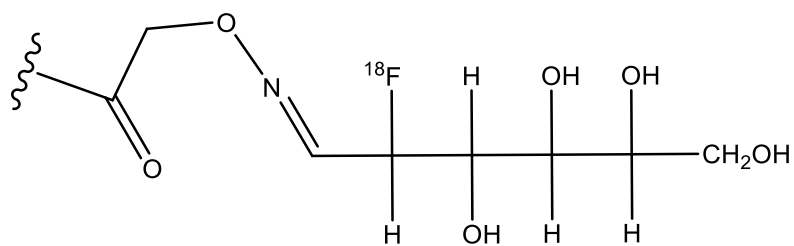
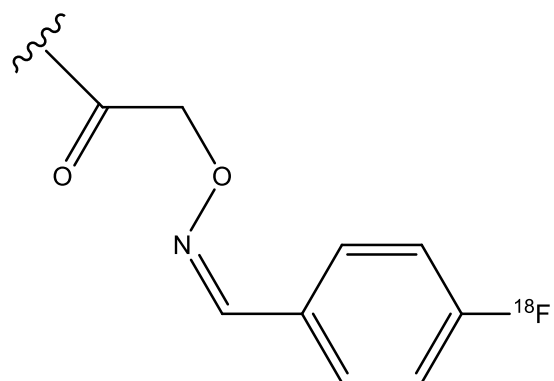
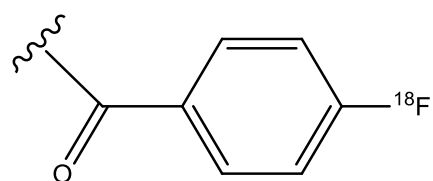
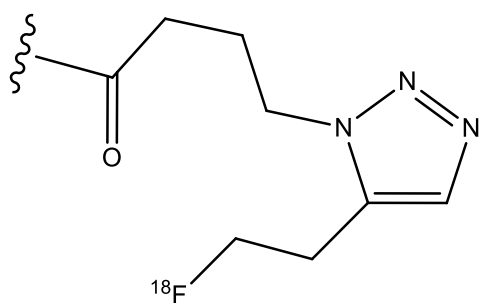
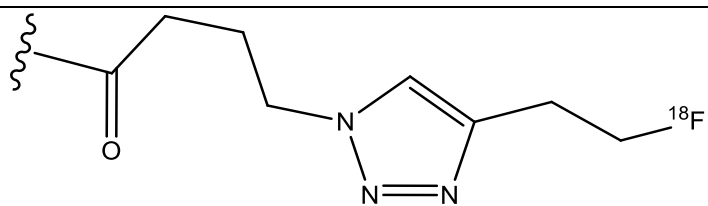
Fórmula I

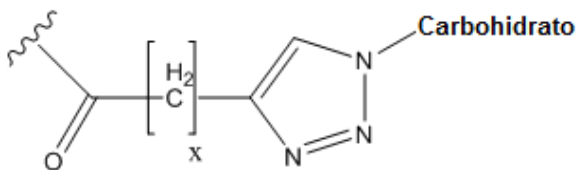
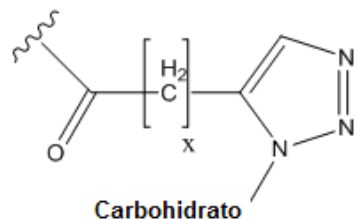
10

con:

i, j	0, 1
m	1 – 5
n	0 – 3
R	H, CH ₃
AS	Aminoácido natural o artificial,
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-benzopirrolil), Benzotiazolilo, Quinoilo
Y:	Arilo, Alquilarilo, Ciclopentilo, Ciclohexilo, Cicloheptilo, N-Piperidil y sal de Piperidil metilado
¹⁸ F- marca:	



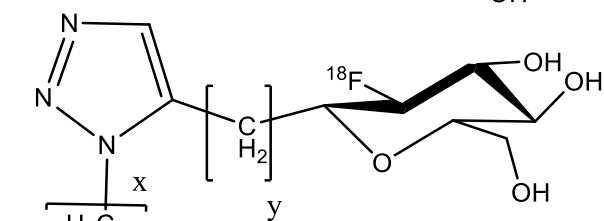
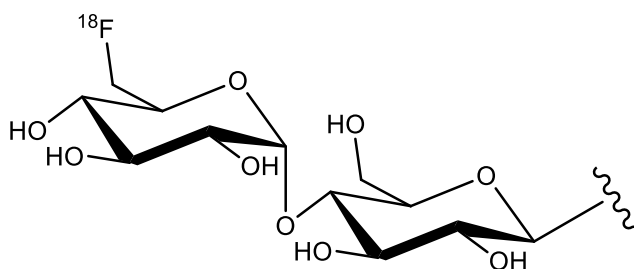
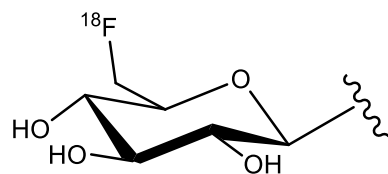
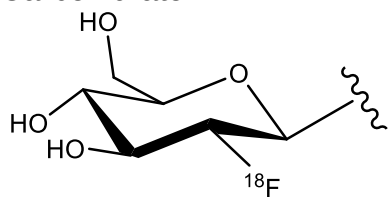




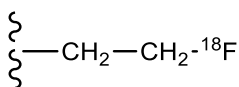
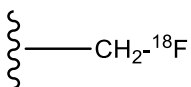
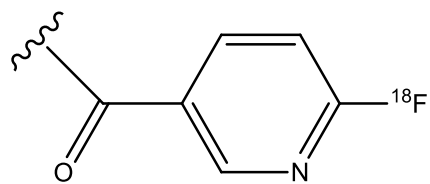
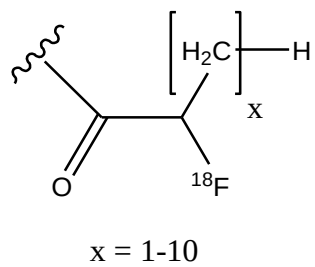
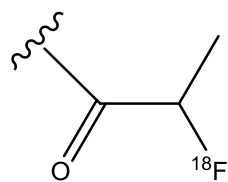
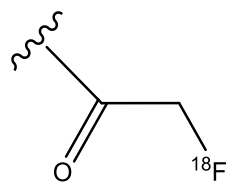
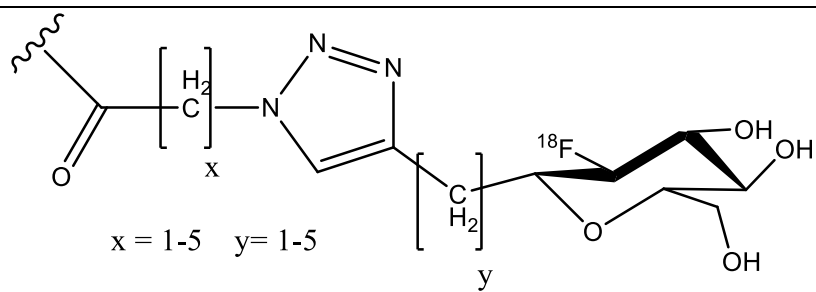
Con:

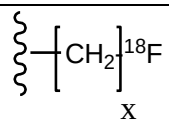
x = 1-5

Carbohidrato :

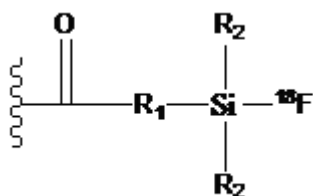
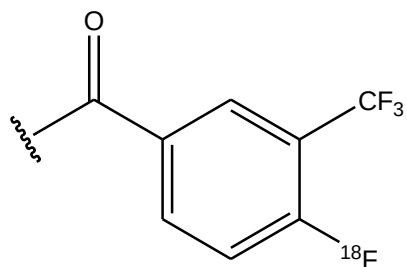
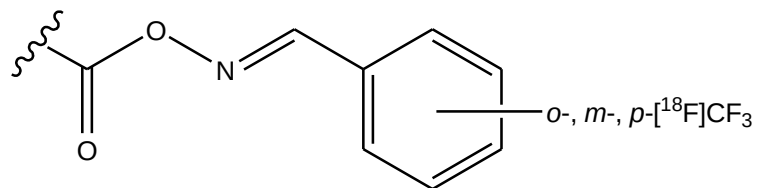
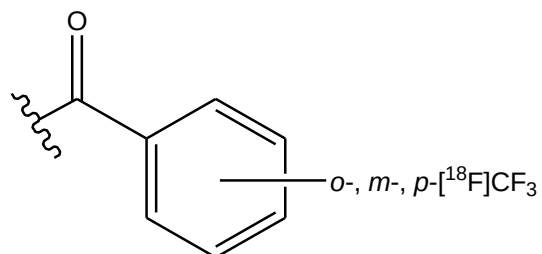
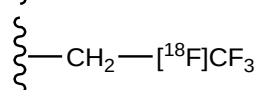
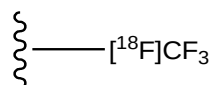


x = 1-5 y = 1-5





$x = 1-10$



R_1 : Cualquier ligador alquilo, arilo y arilalquilo

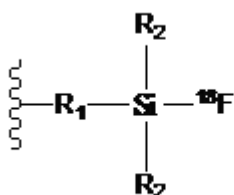
Especialmente metilo, 2-etilo, 3-propilo

2-,3-,4-fenilo, 2-,3-,4-fenilmetilo, 2-,3-,4-fenilpropilo

R₂: Cualquier grupo alquilo o arilo

especialmente metil isopropilo, ter-butilo,

fenilo o 1-naftilo



R₁: Cualquier ligador alquilo, arilo y arilalquilo

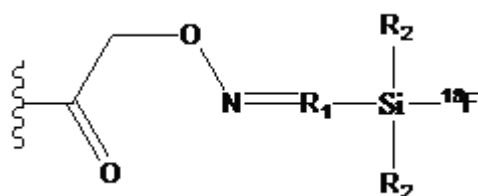
Especialmente metilo, 2-etilo, 3-propilo

2-,3-,4-fenilo, 2-,3-,4-fenilmetilo, 2-,3-,4-fenilpropilo

R₂: Cualquier grupo alquilo o arilo

especialmente metil isopropilo, ter-butilo,

fenilo o 1-naftilo



R₁: Cualquier ligador alquilo, arilo y arilalquilo

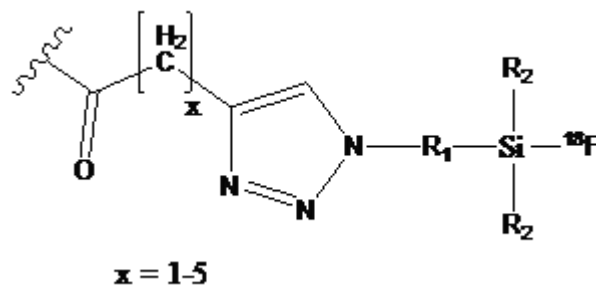
Especialmente metilo, 2-etilo, 3-propilo

2-,3-,4-fenilo, 2-,3-,4-fenilmetilo, 2-,3-,4-fenilpropilo

R₂: Cualquier grupo alquilo o arilo

especialmente metil isopropilo, ter-butilo,

fenilo o 1-naftilo



R₁: Cualquier ligador alquilo, arilo y arilalquilo

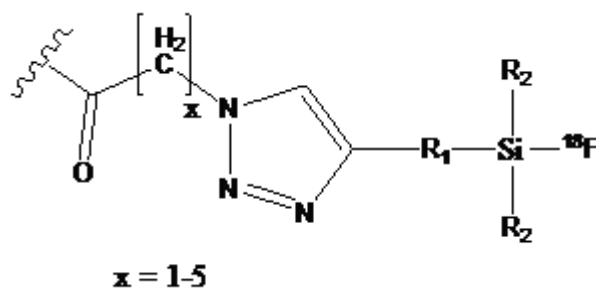
Especialmente metilo, 2-etilo, 3-propilo

2-,3-,4-fenilo, 2-,3-,4-fenilmetilo, 2-,3-,4-fenilpropilo

R₂: Cualquier grupo alquilo o arilo

especialmente metil isopropilo, ter-butilo,

fenilo o 1-naftilo



R₁: Cualquier ligador alquilo, arilo y arilalquilo

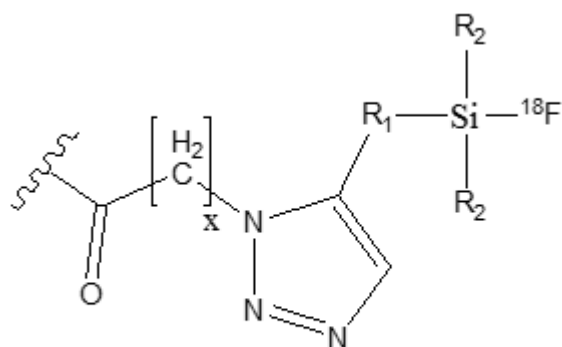
Especialmente metilo, 2-etilo, 3-propilo

2-,3-,4-fenilo, 2-,3-,4-fenilmetilo, 2-,3-,4-fenilpropilo

R₂: Cualquier grupo alquilo o arilo

especialmente metil isopropilo, ter-butilo,

fenilo o 1-naftilo



$x = 1-5$

R₁: Cualquier ligador alquilo, arilo y arilalquilo

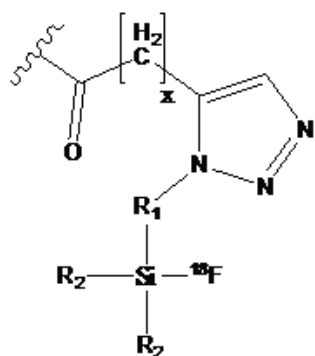
Especialmente metilo, 2-etilo, 3-propilo

2-,3-,4-fenilo, 2-,3-,4-fenilmetilo, 2-,3-,4-fenilpropilo

R₂: Cualquier grupo alquilo o arilo

especialmente metil isopropilo, ter-butilo,

fenilo o 1-naftilo



$x = 1-5$

R₁: Cualquier ligador alquilo, arilo y arilalquilo

Especialmente metilo, 2-etilo, 3-propilo

2-,3-,4-fenilo, 2-,3-,4-fenilmetilo, 2-,3-,4-fenilpropilo

R₂: Cualquier grupo alquilo o arilo

especialmente metil isopropilo, ter-butilo,

fenilo o 1-naftilo

Si no se indica lo contrario, en la presente invención el término "alquilo" por sí mismo o como parte de otra molécula, significa una cadena lineal o ramificada, o un radical hidrocarbonado cíclico, o una combinación de estos, que puede estar completamente saturado, mono o poliinsaturado y puede incluir radicales di- y multivalentes. El residuo "alquilo" con preferencia es C₁ a C₁₀ y puede estar no sustituido o sustituido (por ejemplo, con halógeno). Los residuos alquilo preferidos son metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, ter-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo o n-octilo o similares. Lo mismo también se aplica a los compuestos de cicloalquilo correspondientes que tienen con preferencia de 3 a 10 átomos de carbono, por ejemplo, cicloproilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, etc. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más dobles enlaces o triples enlaces. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, pero sin limitación, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo, y los homólogos e isómeros superiores. El término "alquilo", a menos que se indique lo contrario, también incluye aquellos derivados de alquilo, tales como "heteroalquilo", "haloalquilo" y "homoalquilo".

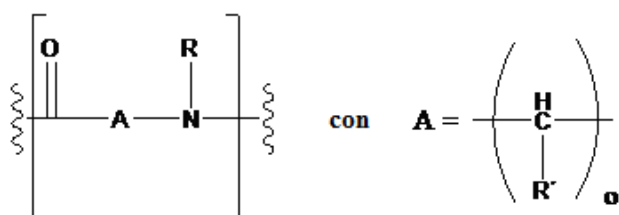
El término "arilo", como se usa en la presente, se refiere a una estructura de anillo cerrado que tiene al menos un anillo que tiene un sistema de electrones pi conjugado e incluye grupos arilo carbocíclico y arilo heterocíclico (o "heteroarilo" o "heteroaromático"). El grupo aromático carbocíclico o heterocíclico puede contener de 5 a 20 átomos anulares. El término incluye anillos monocíclicos unidos de forma covalente o grupos policíclicos de anillo fusionado (es decir, anillos que comparten pares adyacentes de átomos de carbono). Un grupo aromático puede estar no sustituido o sustituido. Los ejemplos no limitantes de grupos "aromáticos" o "arilo" incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 2-bifenilo, 3-bifenilo, 4-bifenilo, antracenilo y fenantracenilo. Los sustituyentes para cada uno de los arilos mencionados anteriormente y los sistemas anulares heteroarilo se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables (por ejemplo, alquilo, carbonilo, carboxilo o halógeno) descritos en la presente. El término "arilo" cuando se usa en combinación con otros términos (que incluyen, pero no se limitan a, ariloxi, ariltioxi, aralquilo) incluye tanto anillos de arilo como heteroarilo. Por lo tanto, el término "aralquilo" o "alcarilo" se

considera que incluye los radicales en los que un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (que incluye, pero no se limita a, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares) incluidos los grupos alquilo en los que un átomo de carbono (que incluye, pero no se limita a, un grupo metileno) ha sido reemplazado por un heteroátomo, a modo de ejemplo solamente, por un átomo de oxígeno. Los ejemplos de tales grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3- (1-naftiloxi) propilo y similares.

"Heteroarilo" se refiere a grupos arilo que contienen al menos un heteroátomo seleccionado de N, O y S; donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, y los átomos de nitrógeno pueden estar opcionalmente cuaternizados. Los grupos heteroarilo pueden estar sustituidos o no sustituidos. Un grupo heteroarilo se puede unir al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Los ejemplos no limitantes de grupos adecuados incluyen 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 4-benzotiazolilo, 5-benzotiazolilo, 6-benzotiazolilo, 7-benzotiazolilo, purinilo, 2-benzimidazolilo, 4-indolilo, 5-indolilo, 6-indolilo, 7-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 2-quinolilo, 3-quinolilo, 4-quinolilo, 5-quinolilo, 6-quinolilo, 7-quinolilo o 8-quinolilo.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y no naturales, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son los 20 aminoácidos comunes en su forma D o L (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina) y pirolisina y selenocisteína. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, a modo de ejemplo solamente, un ex carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R. Tales análogos pueden tener grupos R modificados (a modo de ejemplo, norleucina) o pueden tener esqueletos de péptidos modificados, mientras que

aún retienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Los ejemplos no limitantes de análogos de aminoácidos incluyen homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metilsulfonio. Los aminoácidos se pueden denominar en la presente por su nombre, sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por IUPAC-IUB. Comisión de Nomenclatura Bioquímica. Un "aminoácido no natural" se refiere a un aminoácido que no es uno de los 20 aminoácidos comunes o pirolisina o selenocisteína. Otros términos que se pueden usar como sinónimos del término "aminoácido no natural" son "aminoácido codificado de forma no natural", "aminoácido no natural", "aminoácido de origen no natural" o "aminoácido artificial". El término "aminoácido no natural" incluye, pero no se limita a, aminoácidos que se producen por modificación de un aminoácido codificado de forma natural en su esqueleto o cadenas laterales. En algunas realizaciones, el aminoácido no natural comprende un grupo carbonilo, un grupo acetilo, un grupo aminooxilo, un grupo hidrazina, un grupo hidrazida, un grupo semicarbazida, un grupo azida o un grupo alquino. En una forma de realización preferida, el aminoácido no natural tiene la fórmula



y $\text{R}' = \text{H}, \text{CO}_2\text{H}, \text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}, \text{C}_2\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}, \text{CH}(\text{CO}_2\text{H})_2, \text{CH}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2, \text{CH}(\text{CO}_2\text{H})(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}), \text{CH}_2\text{CH}(\text{CO}_2\text{H})_2, \text{SO}_3\text{H}; o = 1-3; \text{R} = \text{H}, \text{CH}_3$

Se prefieren los aminoácidos que llevan un elemento hidrofílico al compuesto de Fórmula I.

Algunos de los residuos de la presente (que incluyen, entre otros, aminoácidos no naturales) pueden existir en varias formas tautoméricas. Todas estas formas tautoméricas se consideran parte de los compuestos descritos en la presente. Además, por ejemplo, todas las formas de enol-ceto de cualquier compuesto de la presente se consideran parte de las composiciones descritas en la presente.

El ligador B, es decir, los aminoácidos naturales y/o los aminoácidos no naturales pueden estar unidos dentro de la molécula a través de un enlace peptídico o amídico. Sin embargo, en el caso de aminoácidos ácidos (por ejemplo, ácido glutámico, ácido aspártico), la unión puede ser alternativamente a través de la posición α -, β o γ .

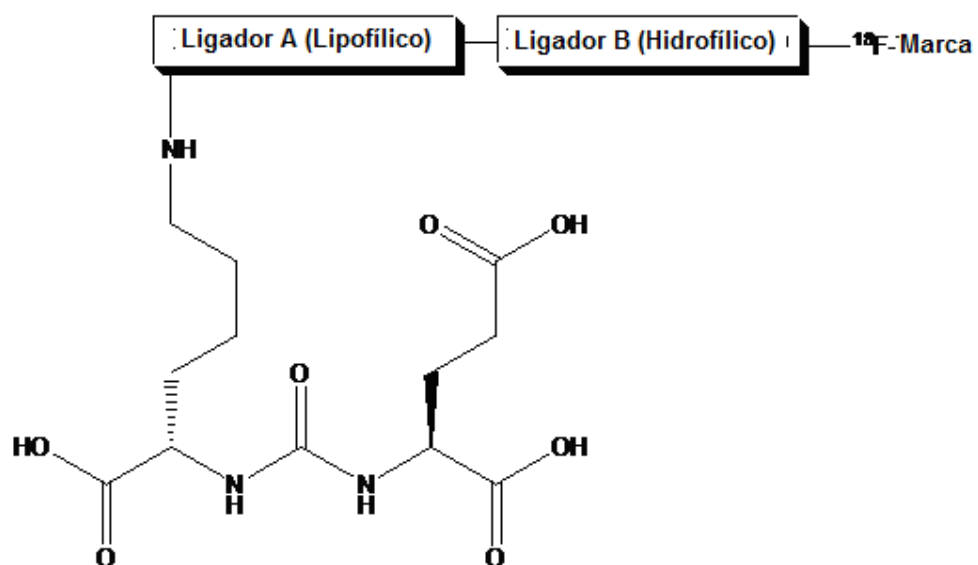
- 5 Aunque se prefiere que el Grupo Z sea $-\text{CO}_2\text{H}$, se puede reemplazar fácilmente con reemplazos biostéricos tales como $-\text{SO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SO}_4\text{H}$, $-\text{PO}_2\text{H}$, $-\text{PO}_3\text{H}$, $-\text{PO}_4\text{H}_2$, ver por ejemplo, "The Practice of Medicinal Chemistry" (Academic Press New York, 1996), página 203.

- 10 Dentro del significado de la invención, todos los residuos se consideran combinables a menos que se indique lo contrario en la definición de los residuos. Todos los subconjuntos concebibles de los mismos se consideran descriptos.

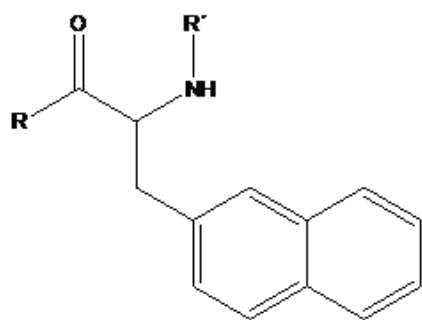
Las ^{18}F -marcas de la Tabla anterior que comprende triazoles existen en dos formas isoméricas que pertenecen tanto a la invención como a las fórmulas dadas.

- 15 En consecuencia, las moléculas preferidas de la presente invención consisten en tres componentes principales (Esquema 1): el motivo de unión de PSMA hidrofílico (Glu-Urea-Lys = Glu-NH-CO-NH-Lys), dos ligadores variables (Ligador A y Ligador B) y la ^{18}F -Marca.

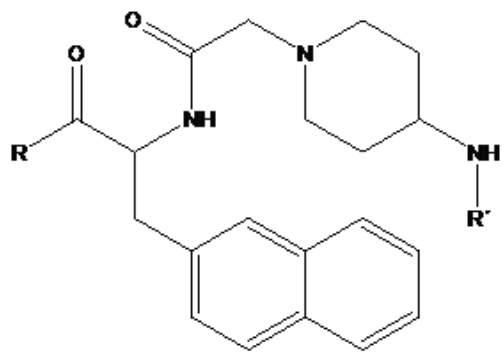
- 20 **Esquema 1:** Estructura de compuestos preferidos de la presente invención



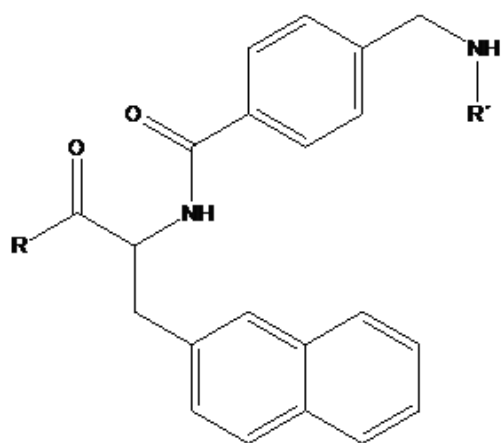
Algunos ligadores lipofílicos preferidos (ligador A) se muestran a continuación, donde R = Glu-urea-Lys (motivo de unión PSMA) y R' = (Ligador B)_m – [¹⁸F-marca] con m=1-5,



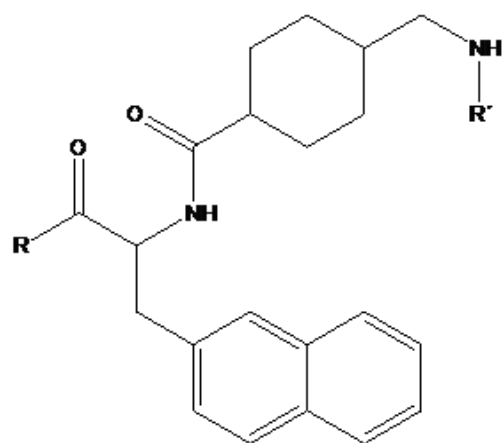
(2-Nal)



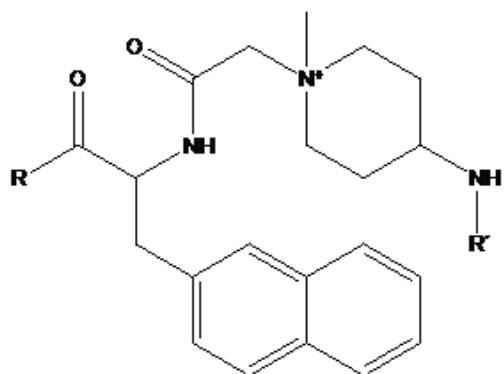
(2-Nal)-(AcAP)



(2-Nal)-(Bn)

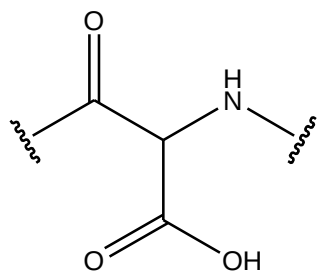


(2-Nal)-(Chx)

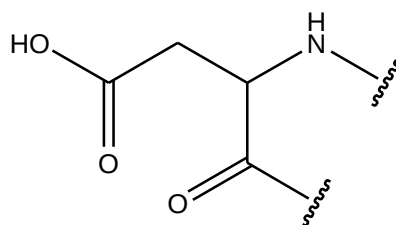


(en forma de cualquier sal farmacéuticamente aceptable)
(2-Nal)-(AcAMP)

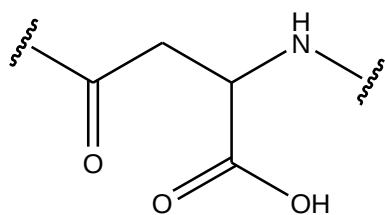
Los diferentes bloques de construcción preferidos para ligadores hidrofílicos (ligador B) se muestran a continuación con su conectividad preferida ejemplificada sobre la base de los aminoácidos únicos respectivos (m = 1 en la estructura genérica)



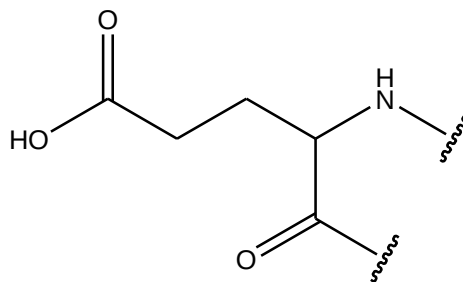
(Mal)



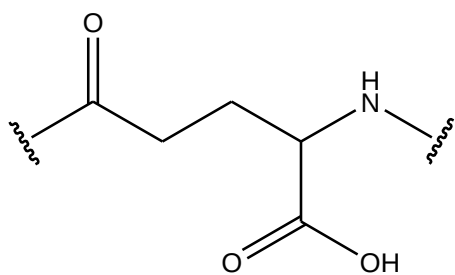
(Asp)



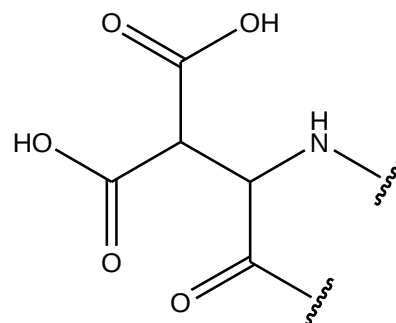
(βAsp)



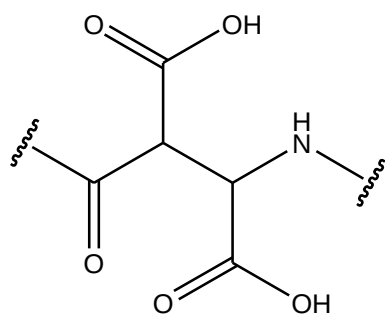
(Glu)



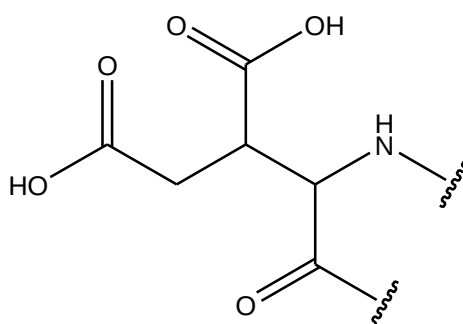
(γGlu)



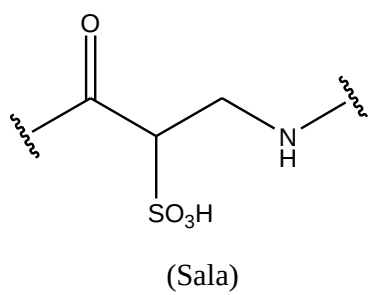
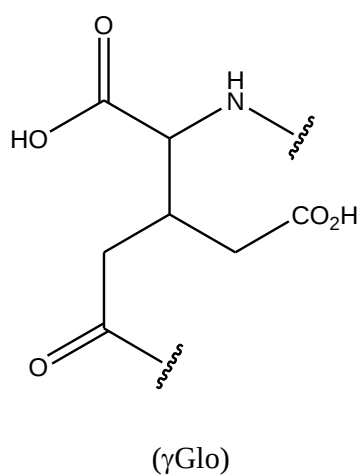
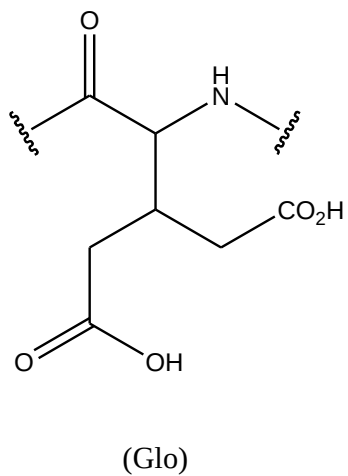
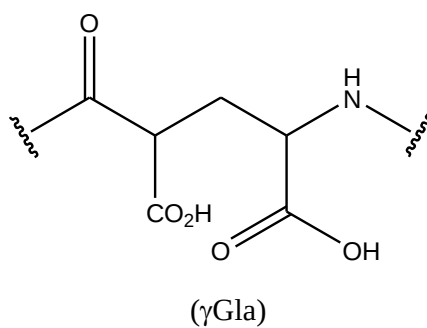
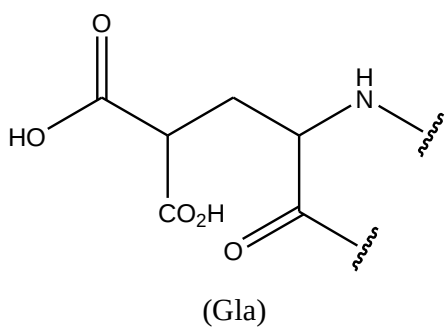
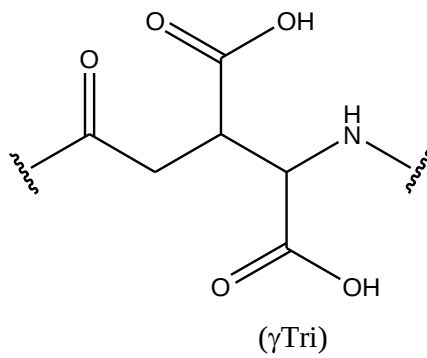
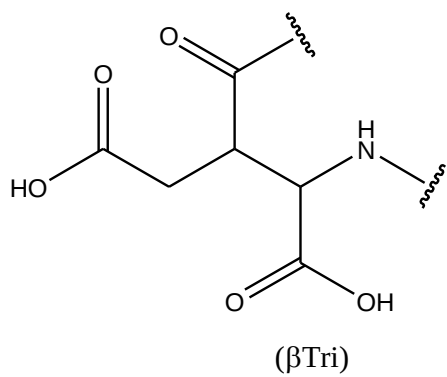
(Lym)



(βLym)



(Tri)



Los ligadores hidrofílicos preferidos también se pueden formar a partir de dos o más bloques de construcción ($m = 2 - 5$ en la fórmula genérica), con preferencia seleccionados de los bloques de construcción ácidos enumerados anteriormente. Los

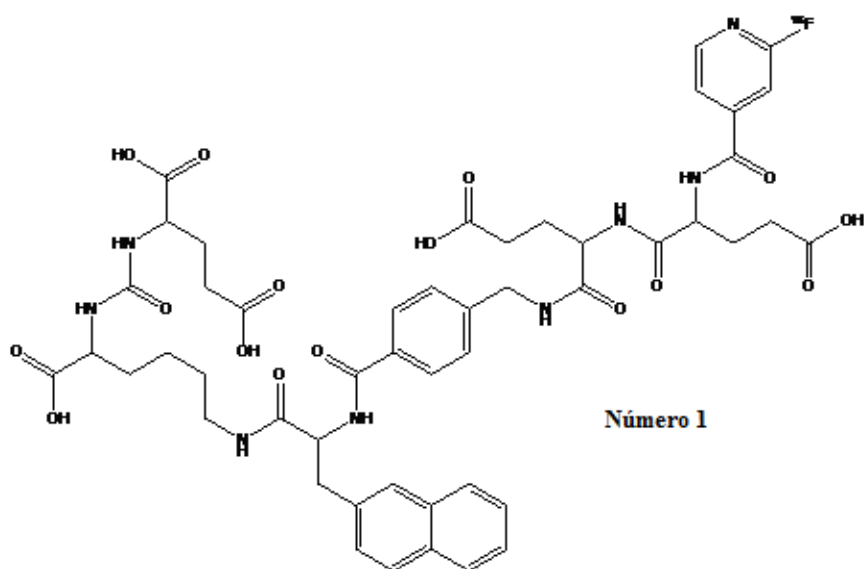
5 preferidos son 1-3 bloques de construcción.

En la tabla siguiente se listan numerosas estructuras preferidas:

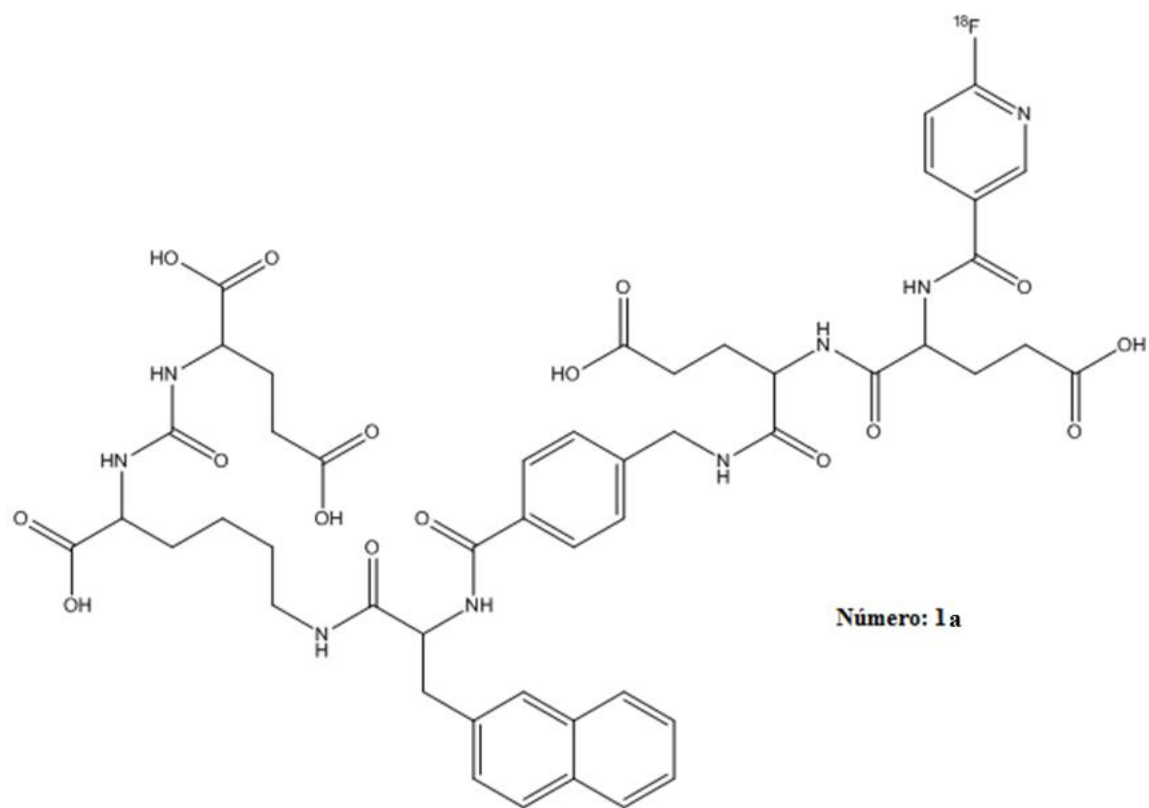
Número	Ligador lipofílico (= Ligador A)	Ligador hidrofílico (= Ligador B)			¹⁸ F-Marca
		Pos. 1	Pos.2	Pos. 3	
1	(2-Nal)-(Bn)	(Glu)	(Glu)	-	[¹⁸ F]FN
2	(2-Nal)	(Glu)	(Glu)	-	[¹⁸ F]FN
3	(2-Nal)	(γGlu)	(Glu)	-	[¹⁸ F]FN
4	(2-Nal)-(Bn)	(Glu)	-	-	[¹⁸ F]FN
5	(2-Nal)-(AcAMP)	(γGlu)	(γGlu)	-	[¹⁸ F]FN
6	(2-Nal)-(Bn)	(Glu)	(γGlu)	-	[¹⁸ F]FN
7	(2-Nal)-(Bn)	(γGlu)	(Glu)	-	[¹⁸ F]FN
8	(2-Nal)-(Bn)	(γGlu)	(γGlu)	-	[¹⁸ F]FN
9	(2-Nal)-(Bn)	(Asp)	(Glu)	-	[¹⁸ F]FN
10	(2-Nal)-(Bn)	(βAsp)	(Glu)	-	[¹⁸ F]FN
11	(2-Nal)-(Bn)	(Asp)	(γGlu)	-	[¹⁸ F]FN
12	(2-Nal)-(Bn)	(βAsp)	(γGlu)	-	[¹⁸ F]FN
13	(2-Nal)-(Bn)	(Mal)	(Glu)	-	[¹⁸ F]FN
14	(2-Nal)-(Bn)	(Mal)	(γGlu)	-	[¹⁸ F]FN
15	(2-Nal)-(Bn)	(Gla)	(Glu)	-	[¹⁸ F]FN
16	(2-Nal)-(Bn)	(γGla)	(Glu)	-	[¹⁸ F]FN
17	(2-Nal)-(Bn)	(Gla)	(γGlu)	-	[¹⁸ F]FN
18	(2-Nal)-(Bn)	(γGla)	(γGlu)	-	[¹⁸ F]FN

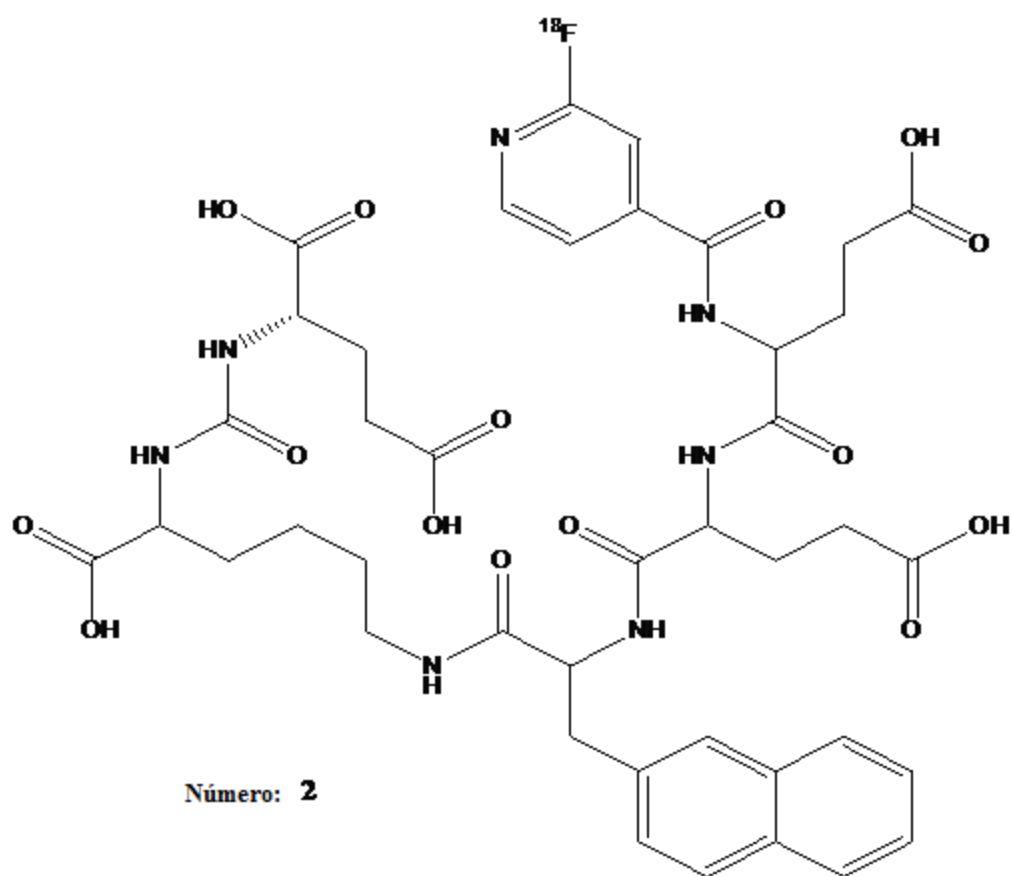
Las estructuras de los compuestos preferidos 1-18 ejemplificados en la tabla anterior se muestran a continuación:

Siguientes:

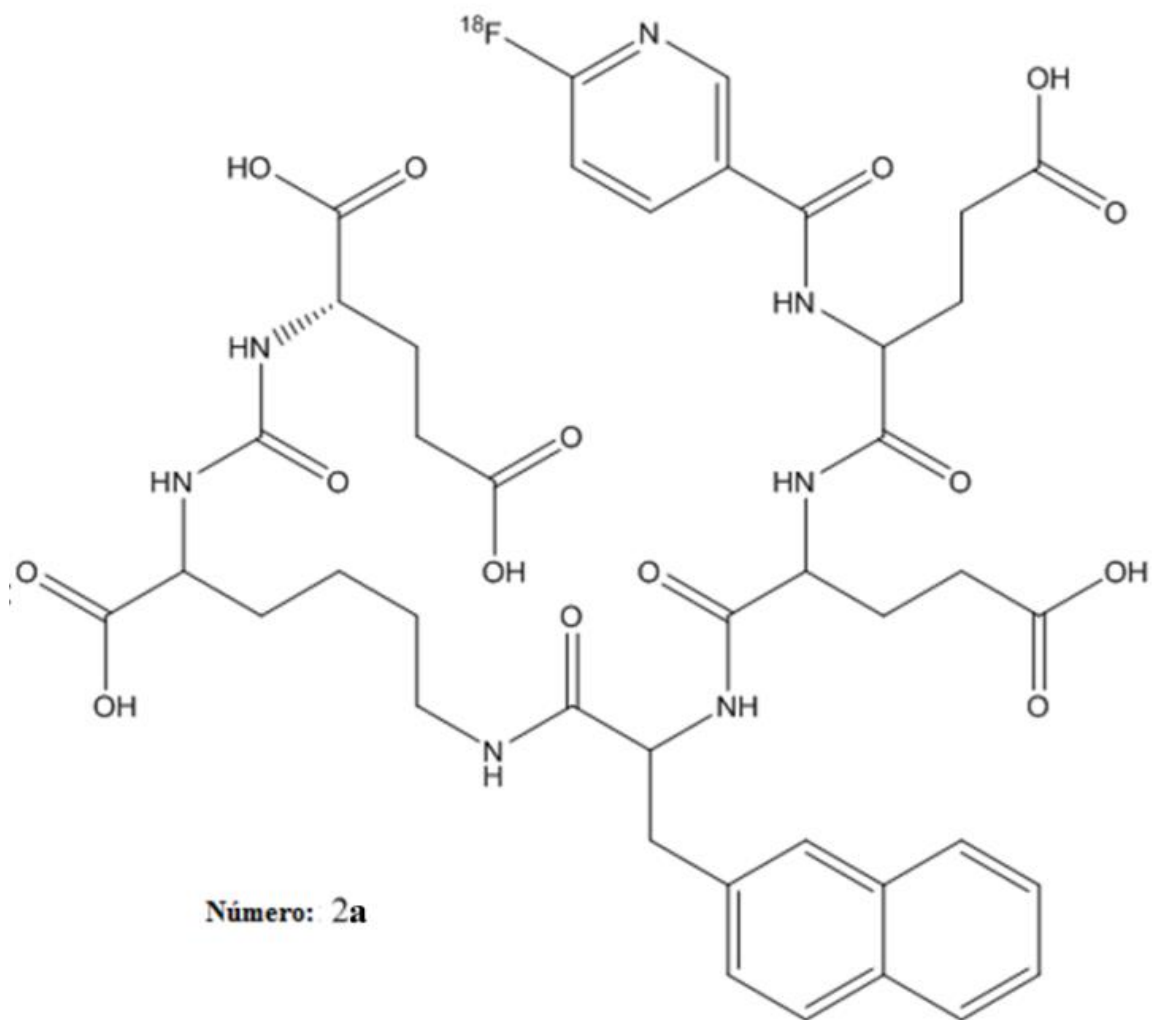


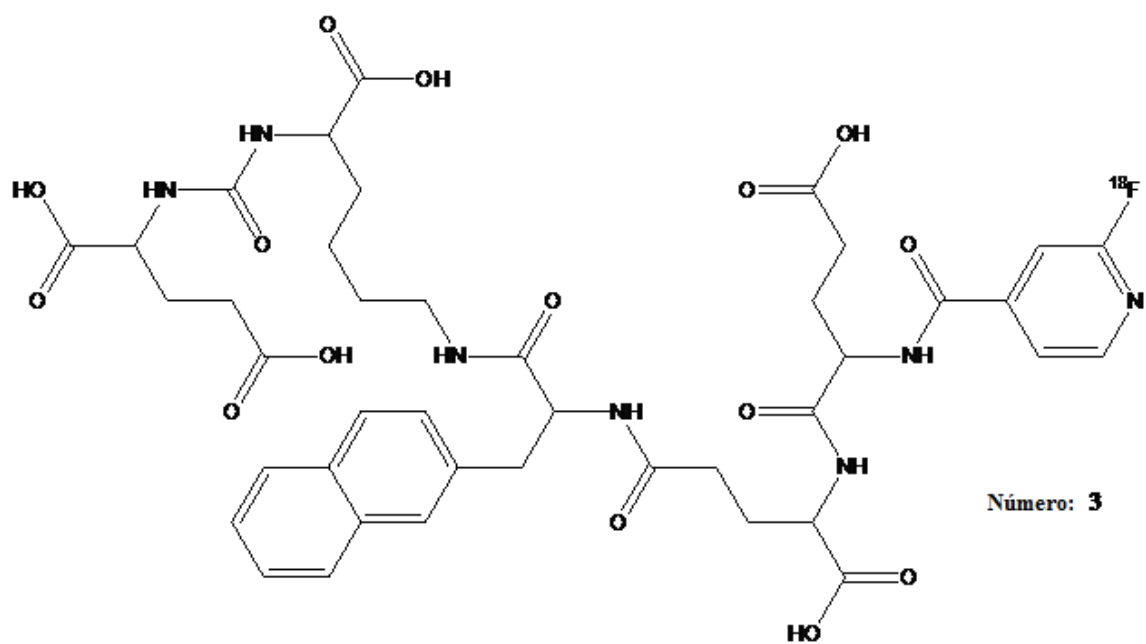
0



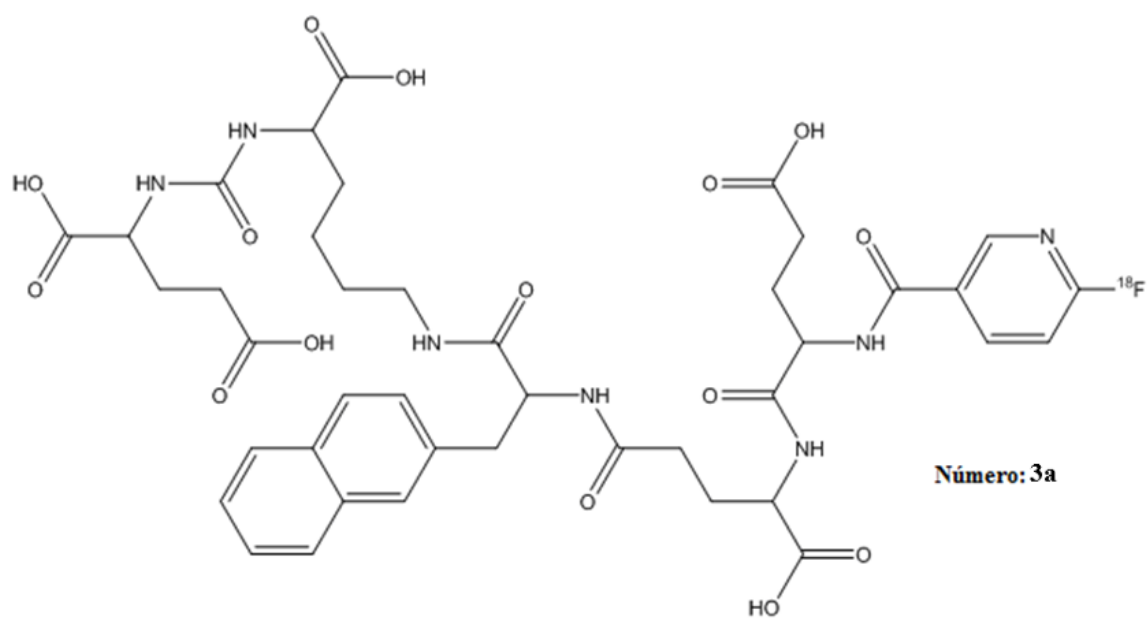


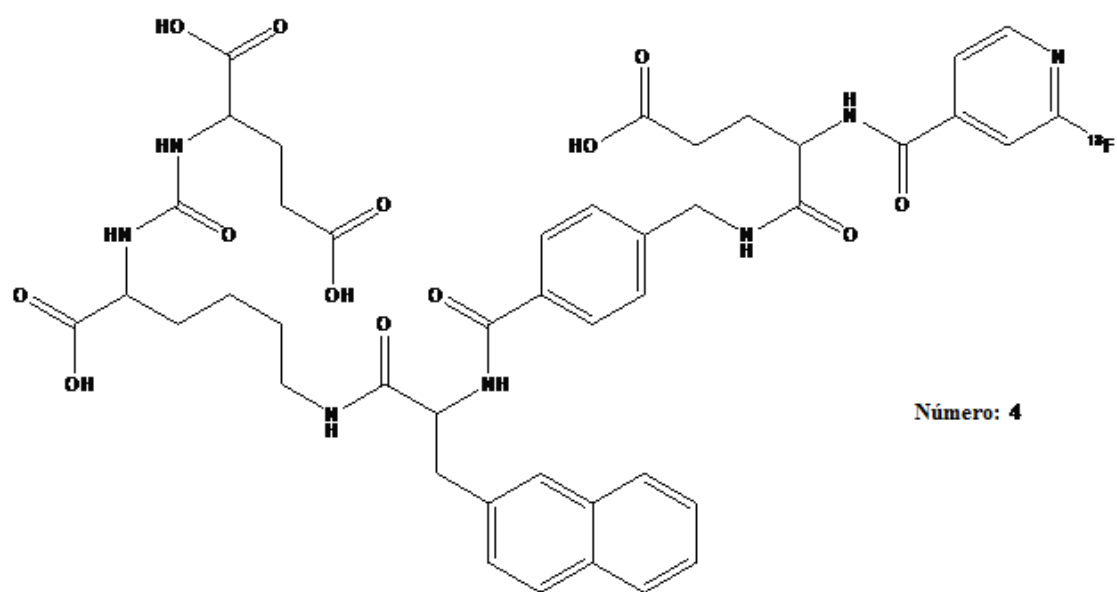
0





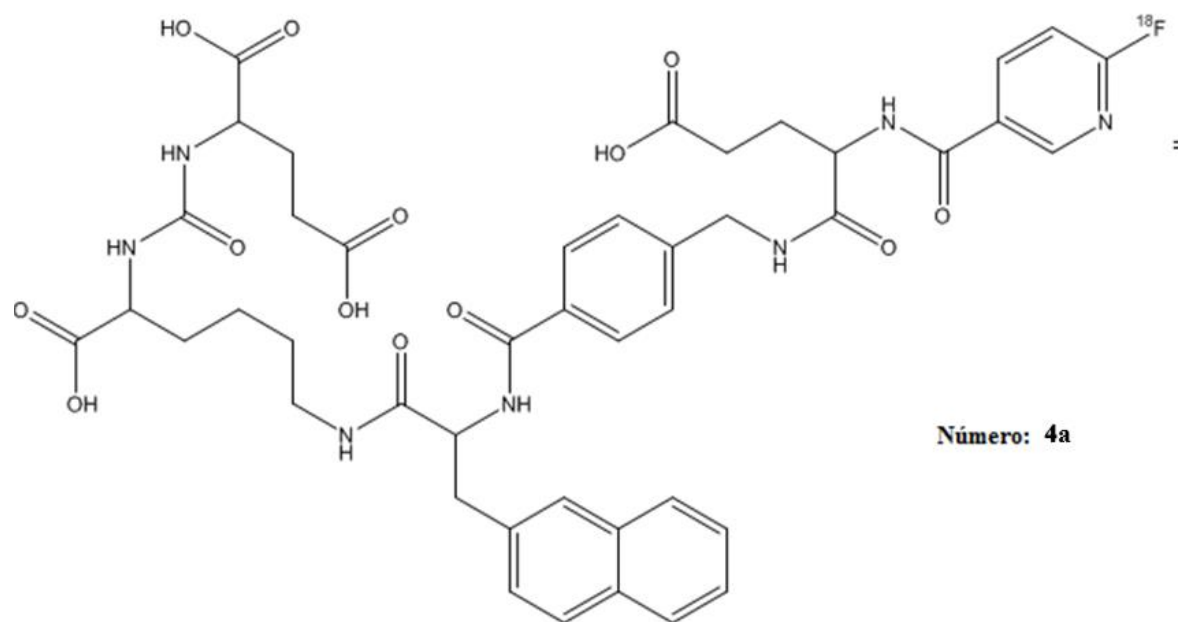
O



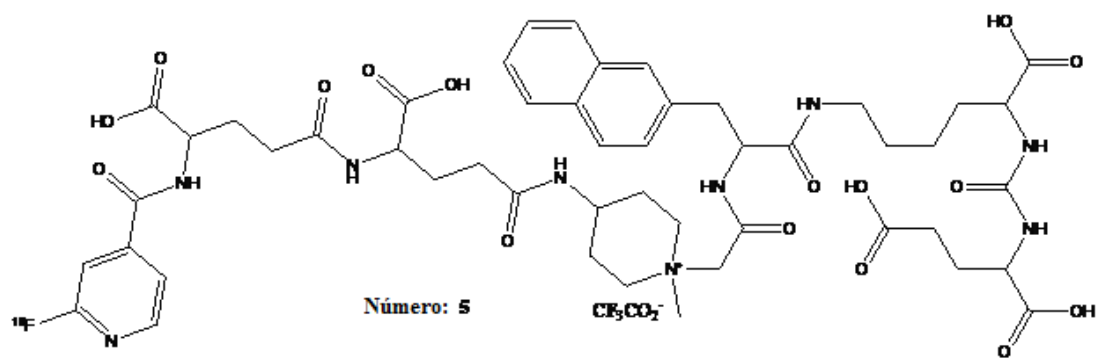


Número: 4

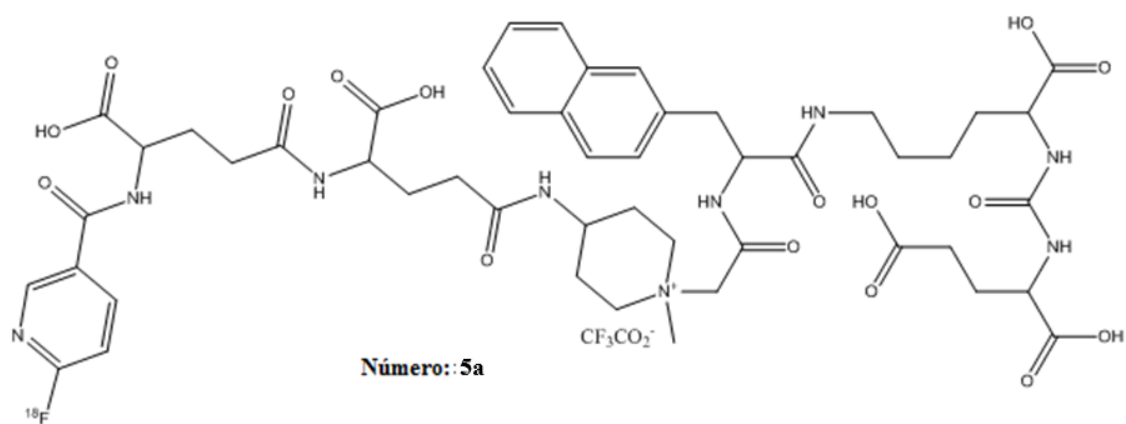
0

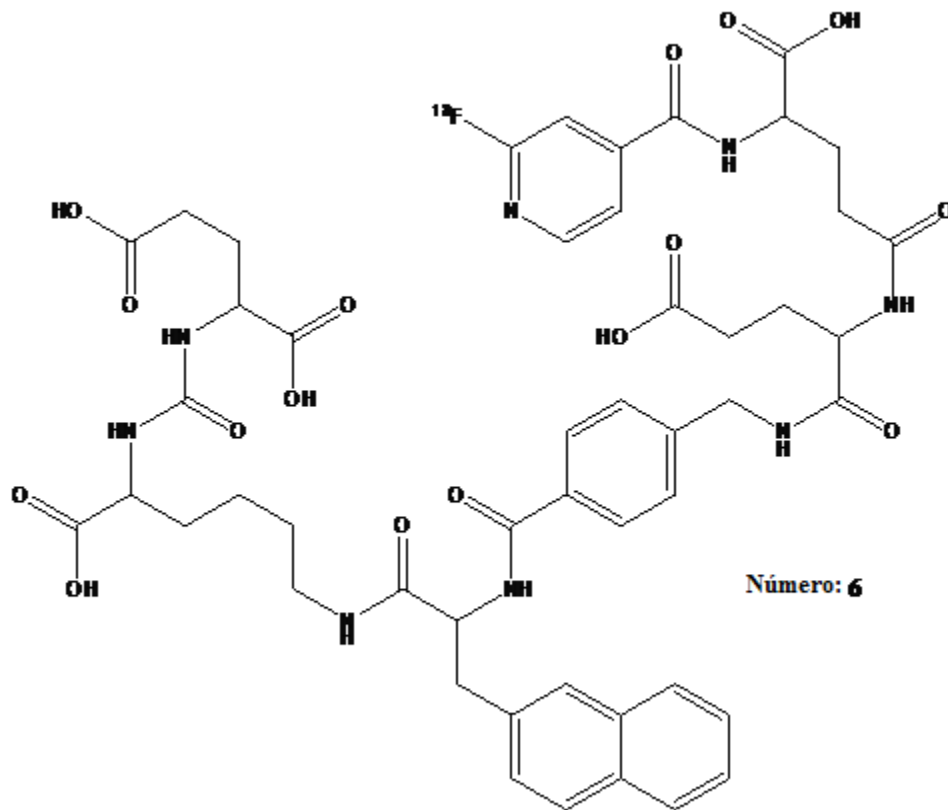


Número: 4a

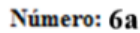


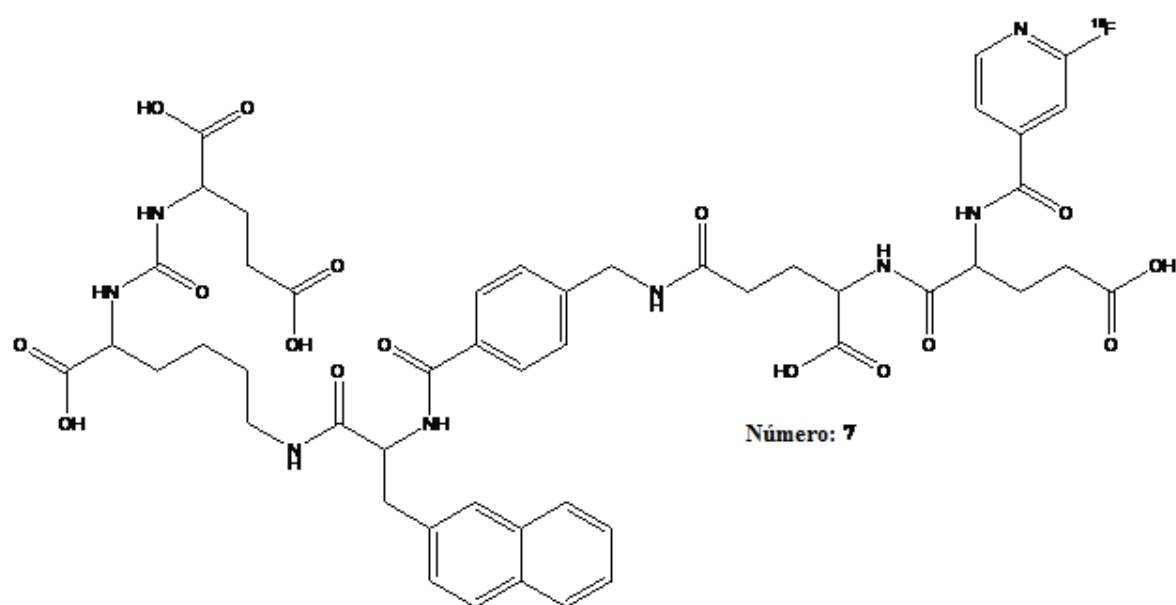
0



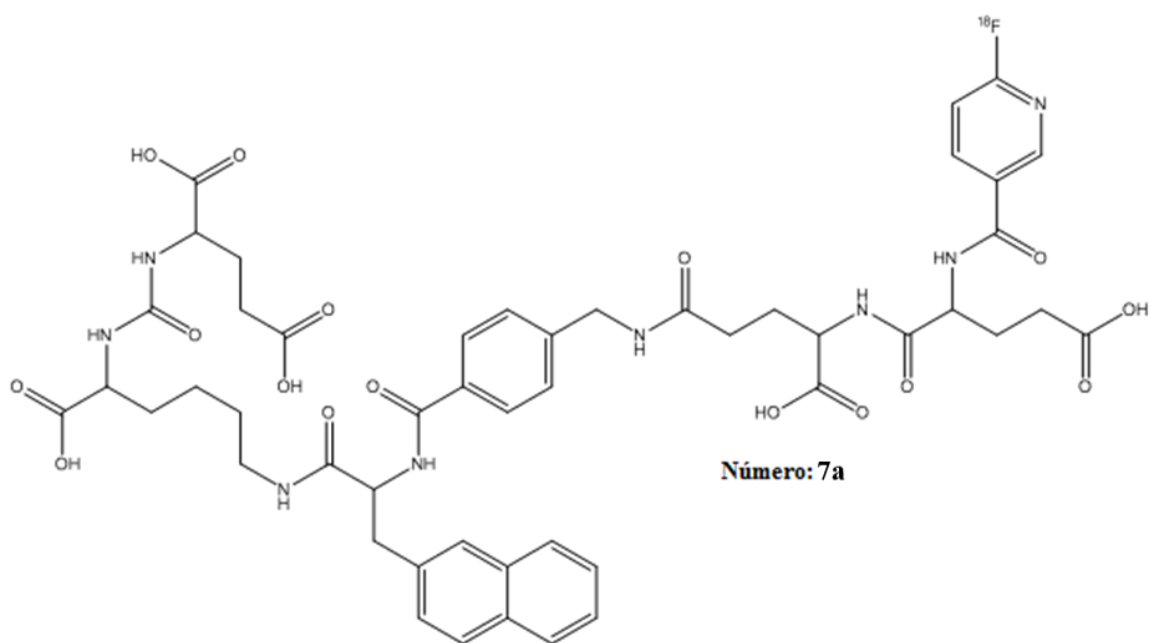


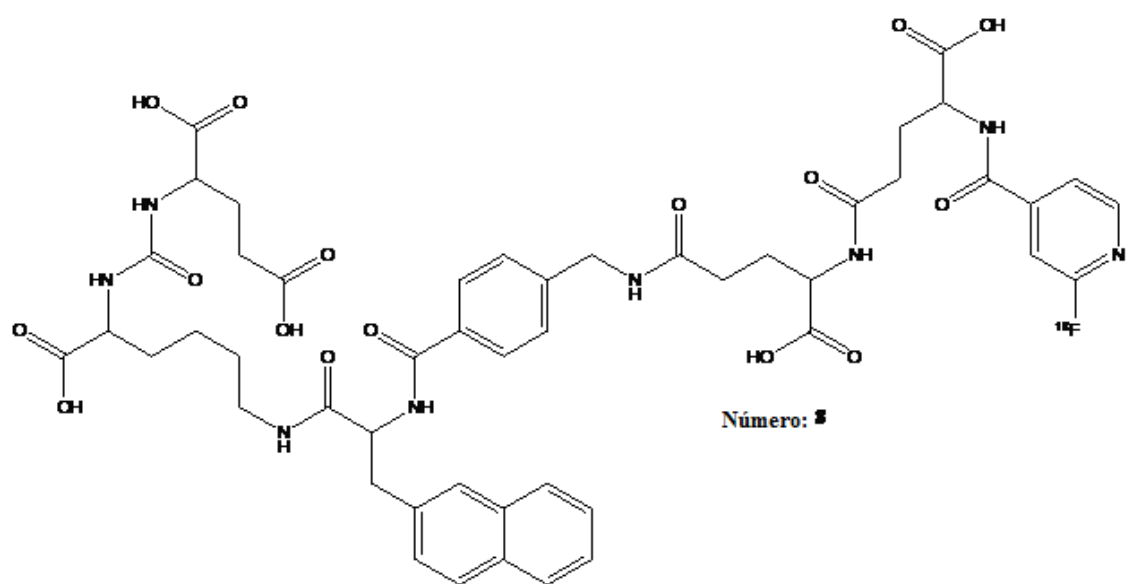
0



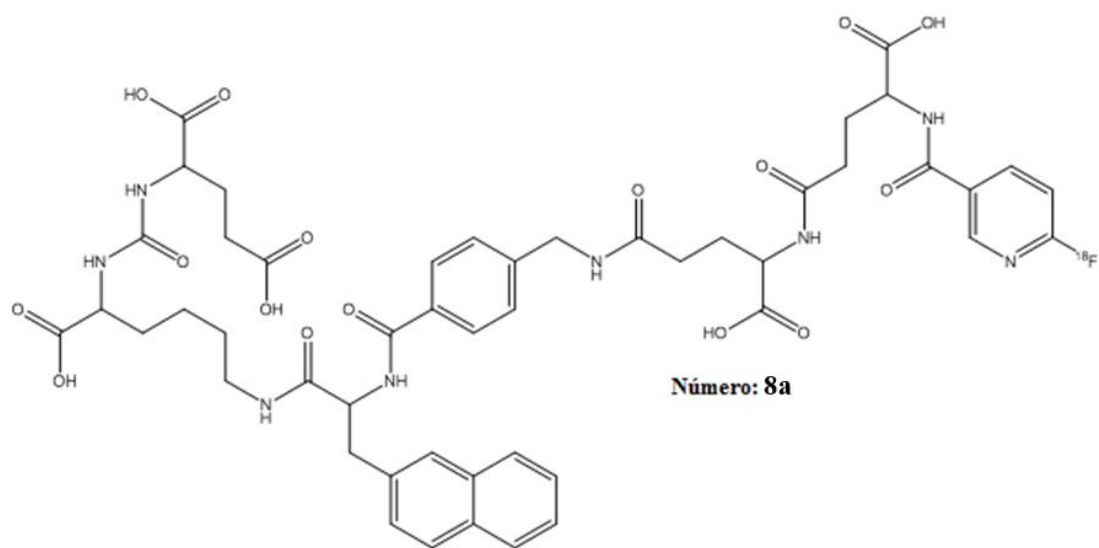


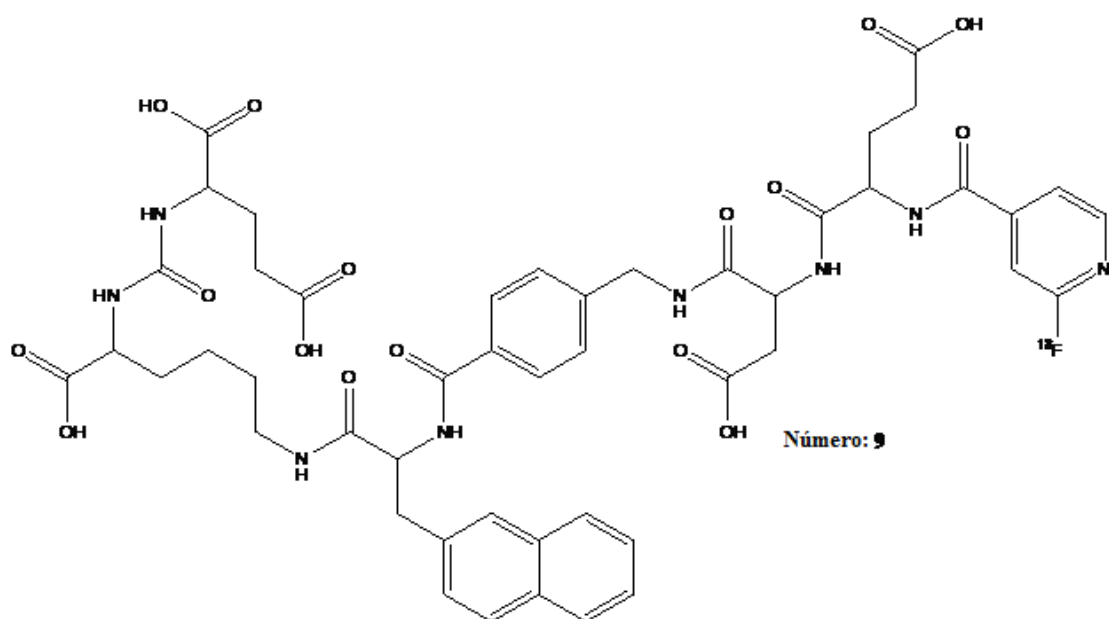
0



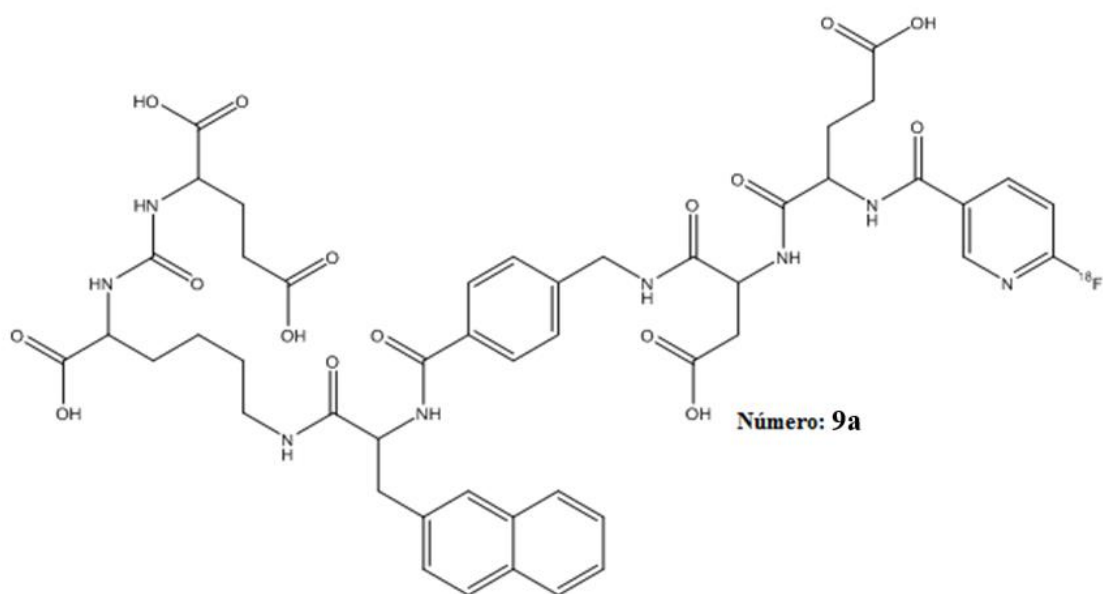


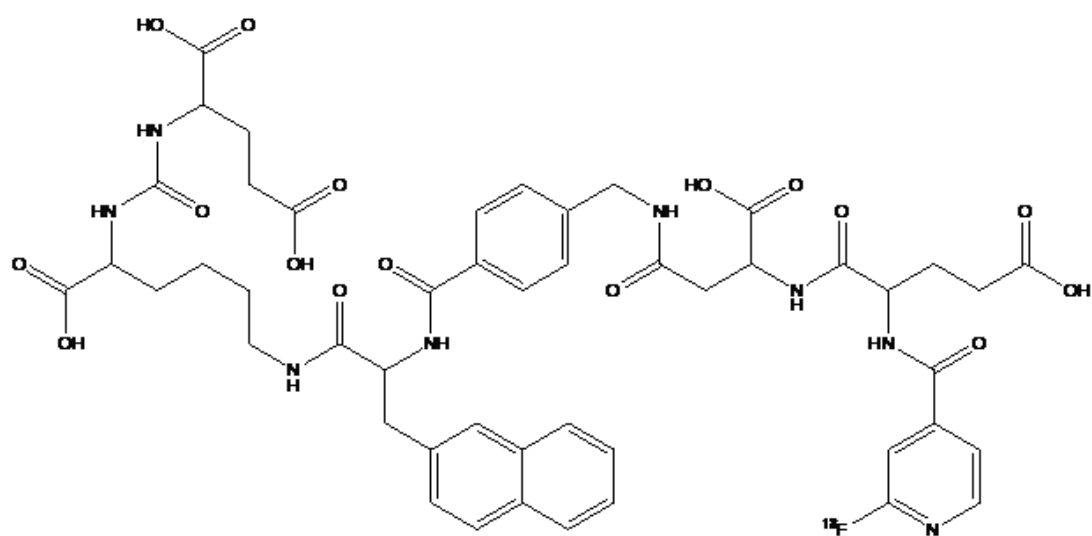
0





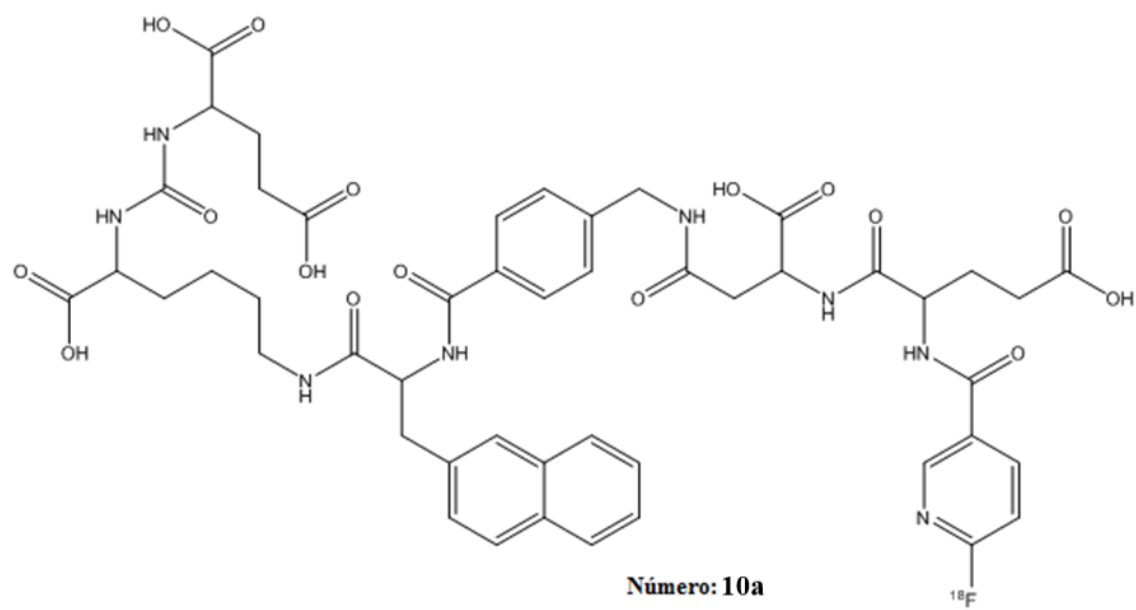
O



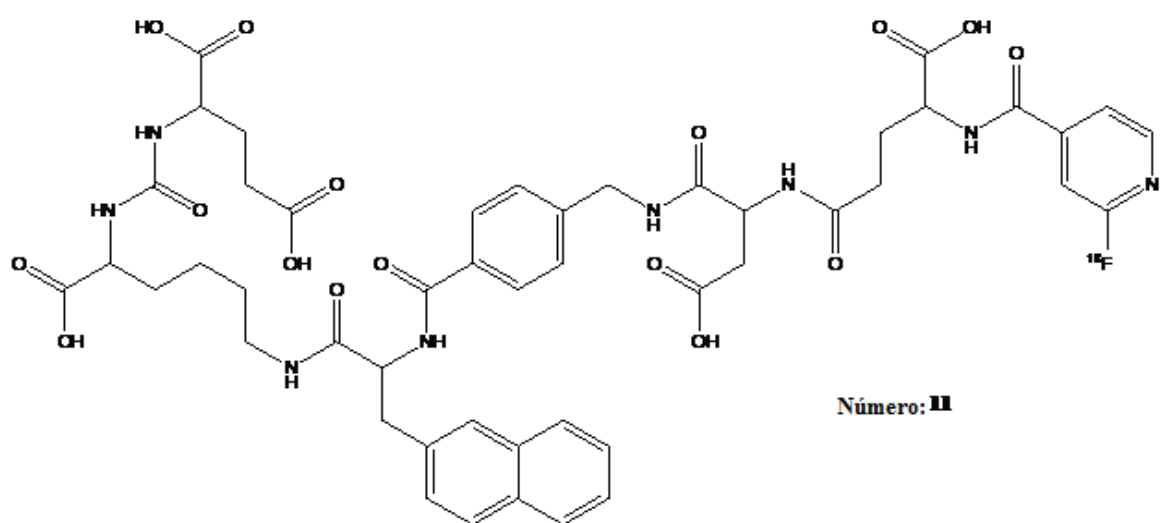


Número: 10

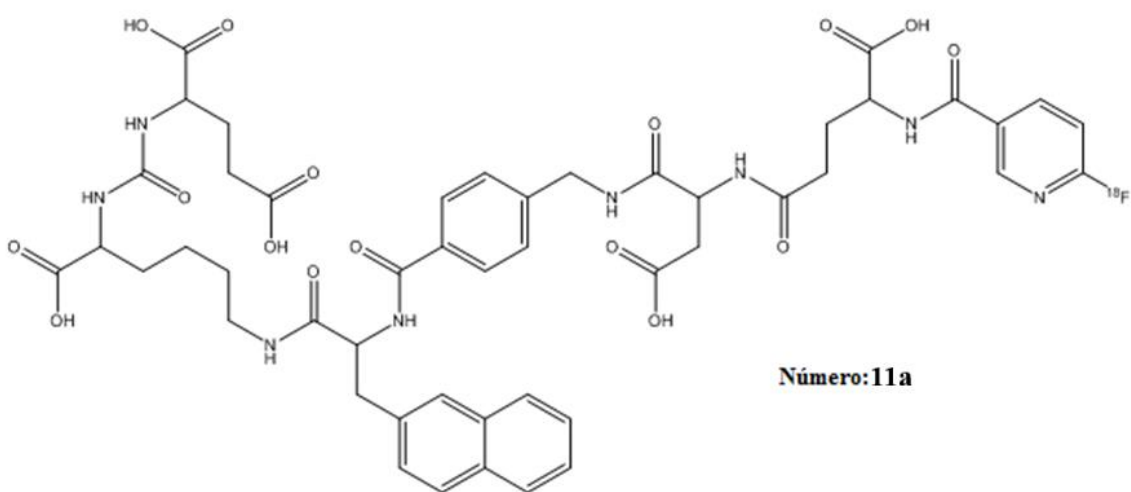
0

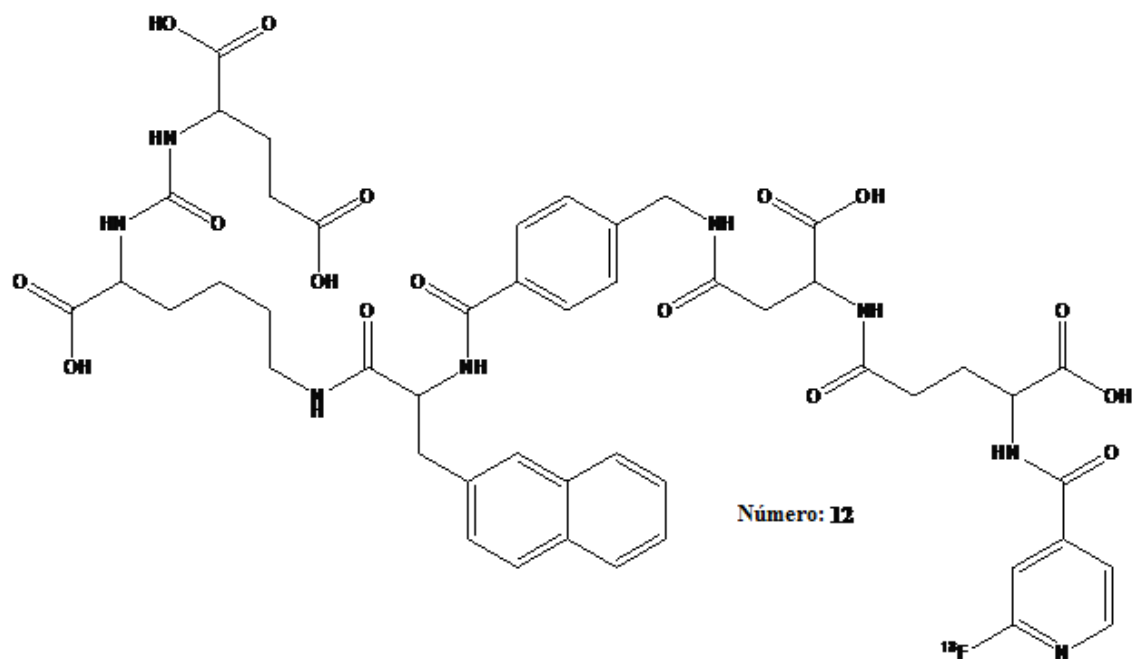


Número: 10a

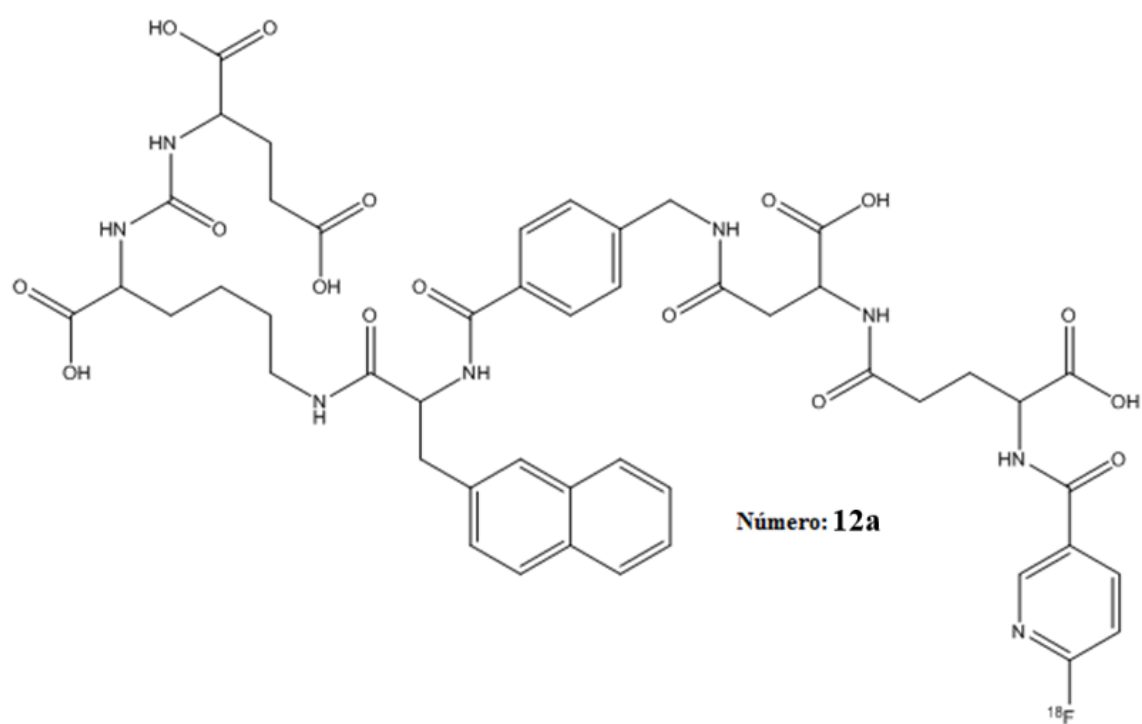


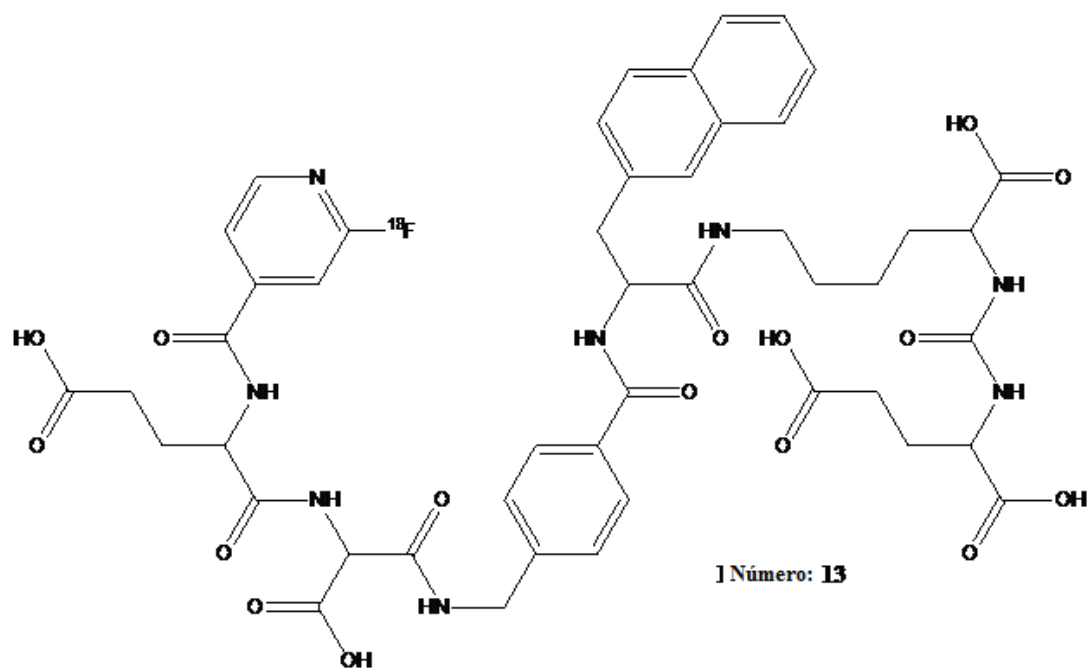
0



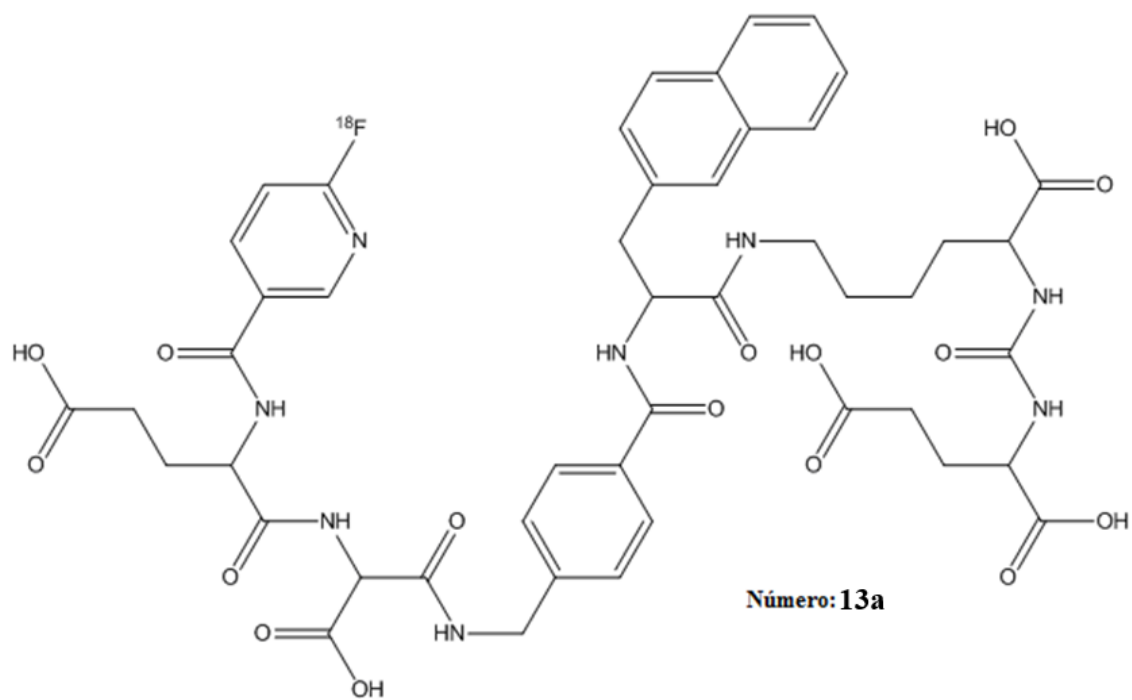


0

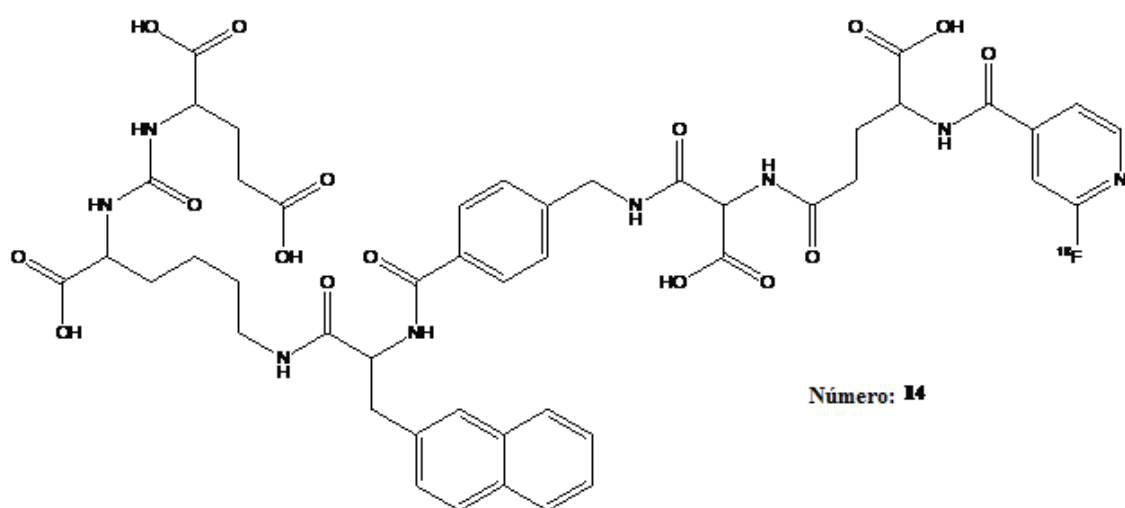




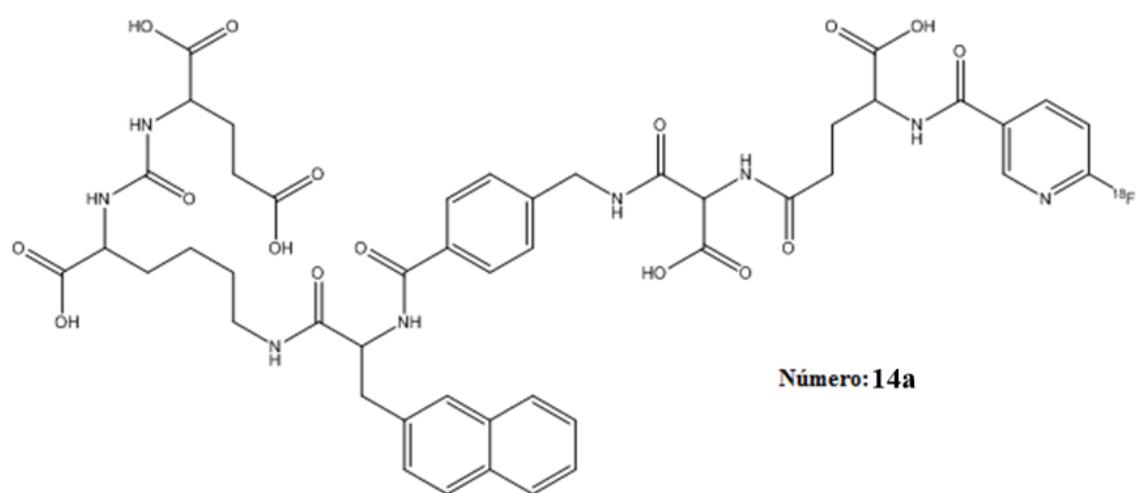
0

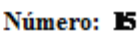


5

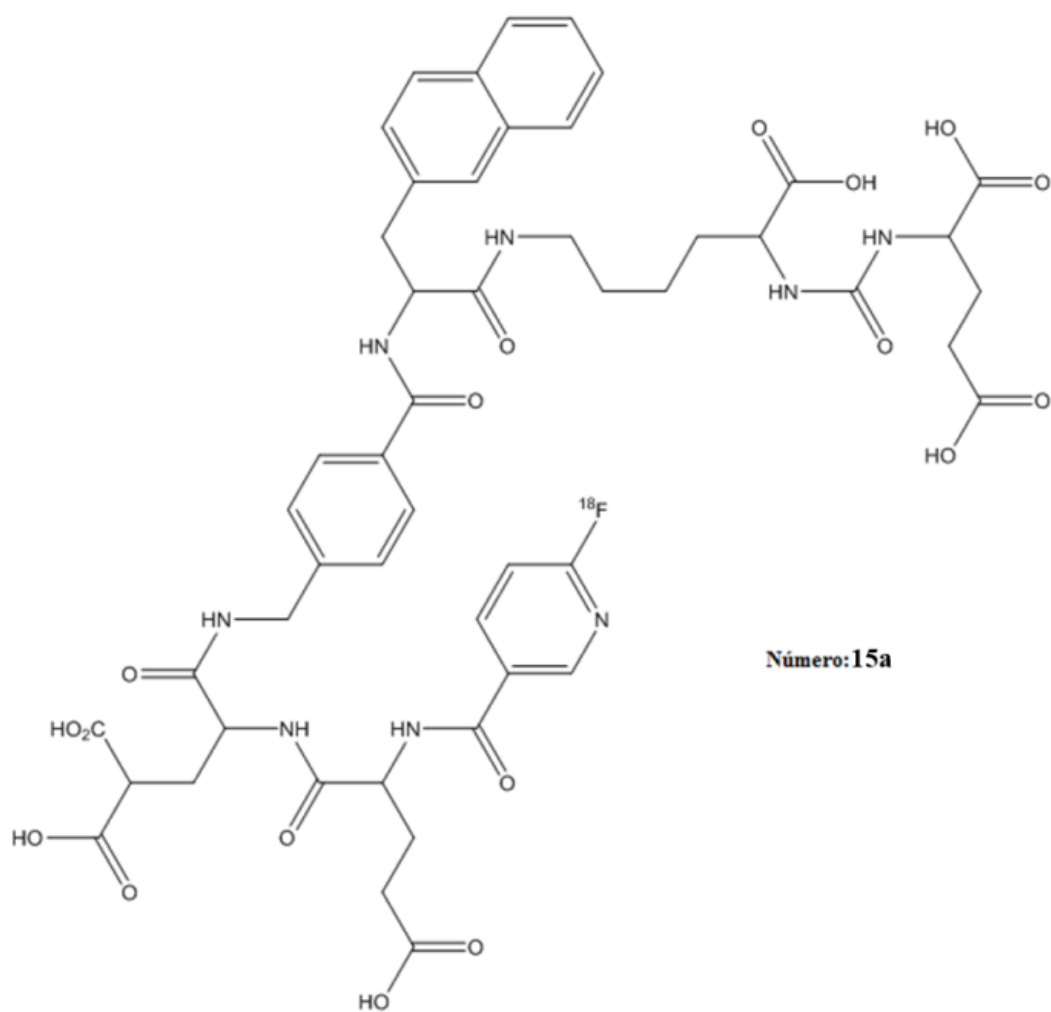


O

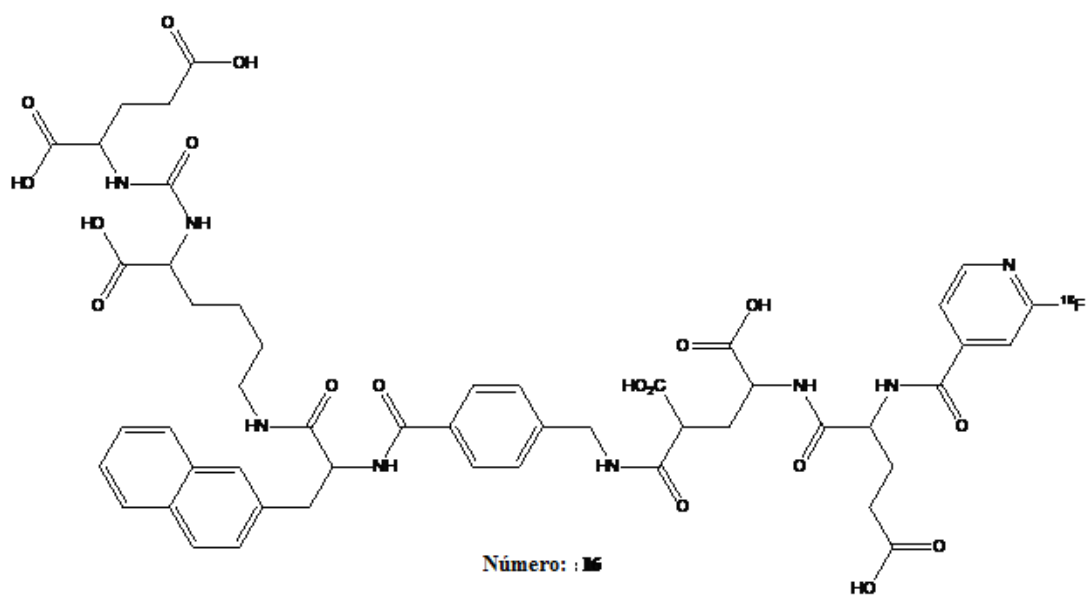




GPZ-306871-v1

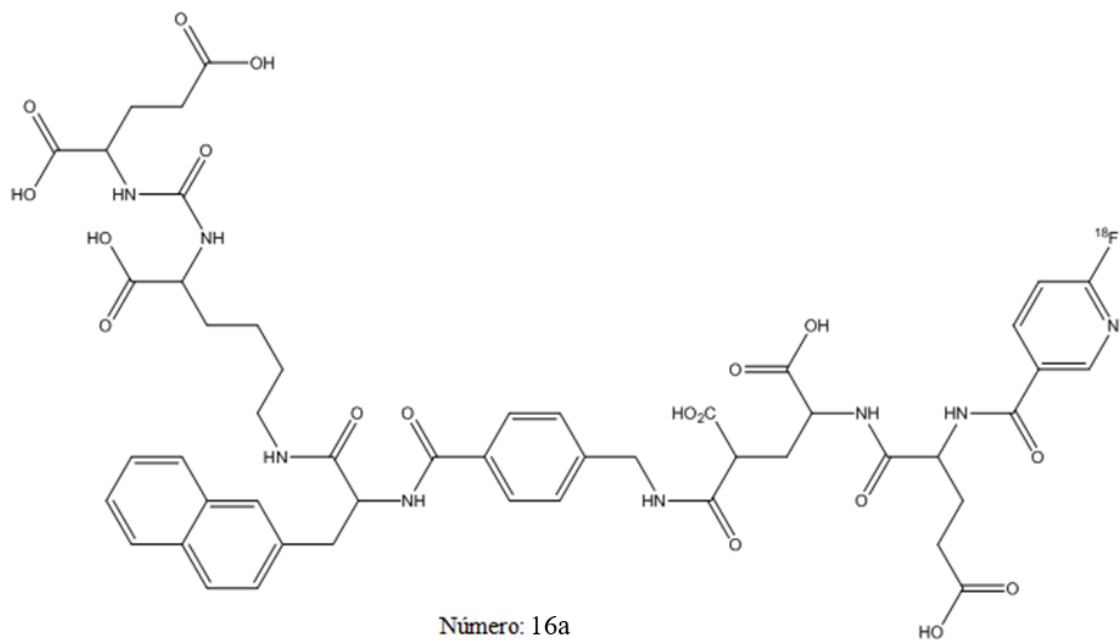


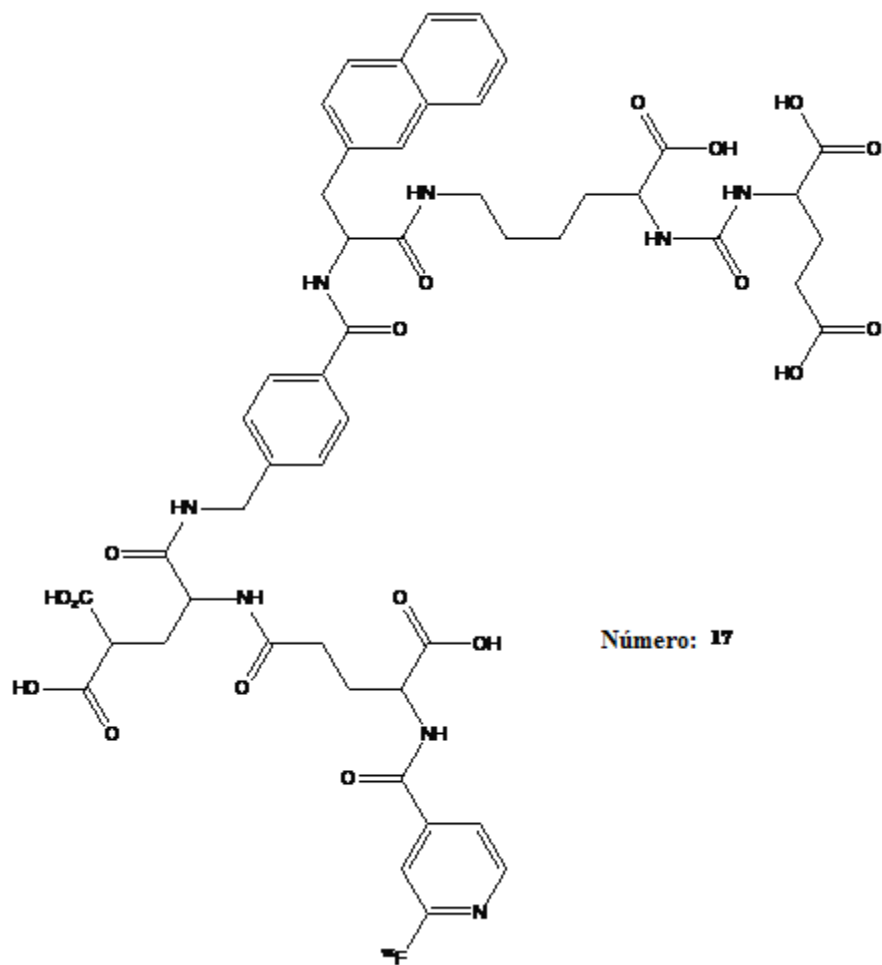
Número: 15a



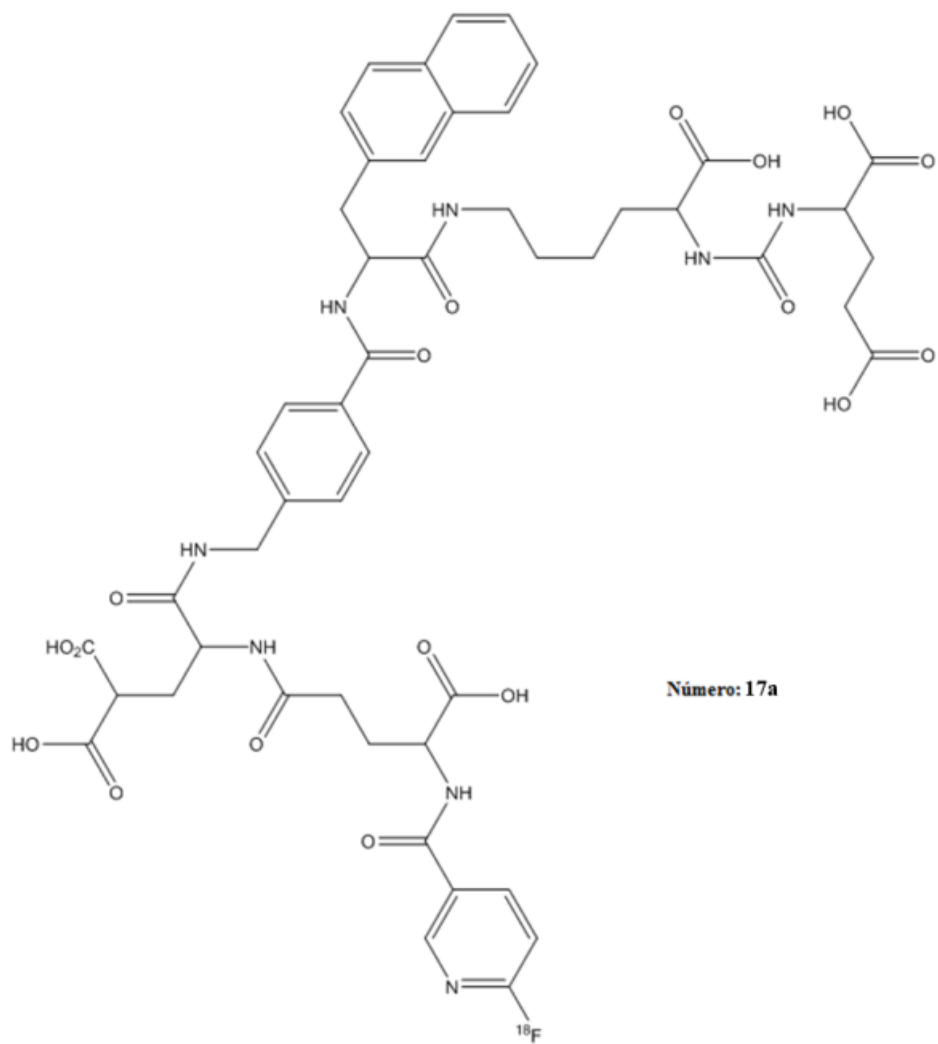
Número: 16

0

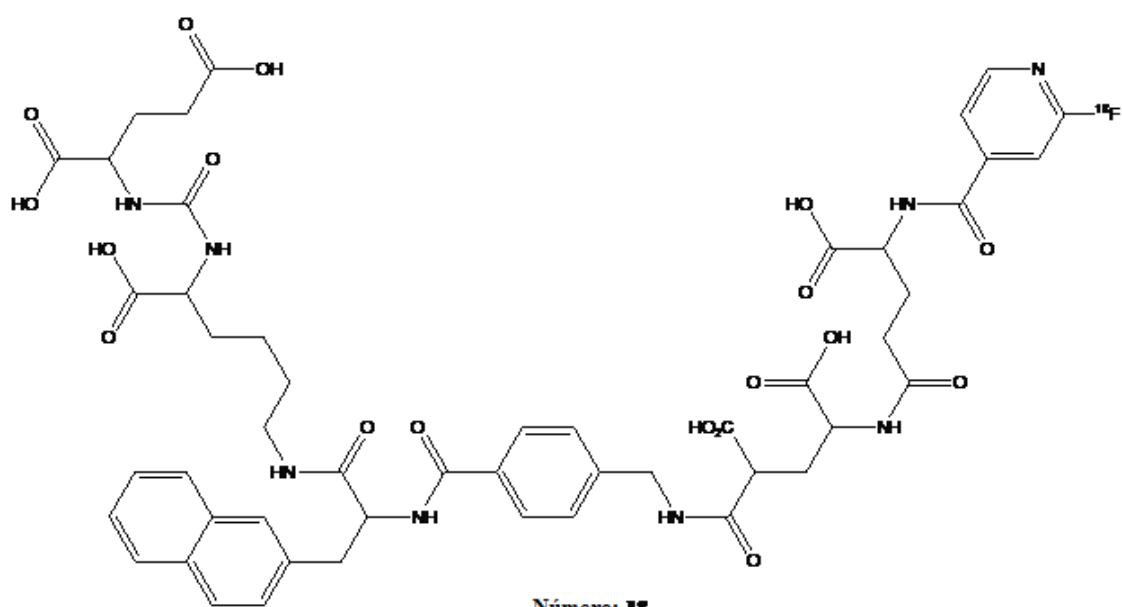




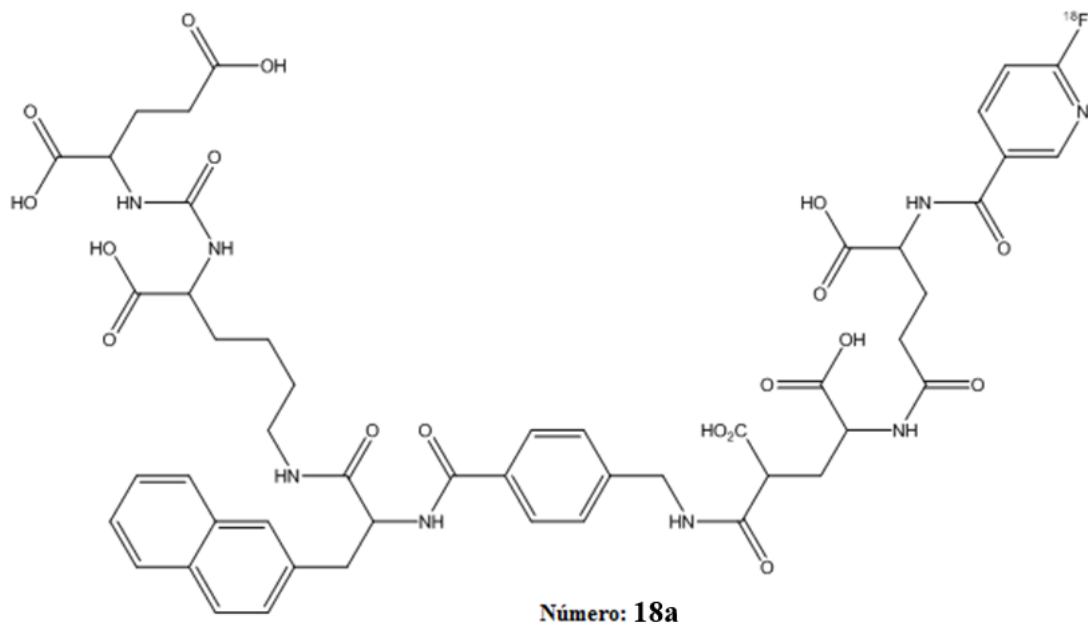
0



Número: 17a



0



5

Como puede comprender un experto en la materia, los compuestos preferidos 1-18 mencionados anteriormente no están limitados a las marcas ^{18}F como se muestra, pero las marcas ^{18}F son fácilmente intercambiables por técnicas estándar y en cambio se puede usar cualquiera de las marcas ^{18}F -ejemplificadas en relación con la Fórmula I.

- 5 La invención también se refiere a precursores o sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula general I. La invención también se refiere a solvatos de los compuestos, que incluye las sales así como sus metabolitos activos y, cuando sea apropiado, los tautómeros de estos de acuerdo con la fórmula general I, que las formulaciones de profármaco.
- 10 Una "sal farmacéuticamente aceptable" es una sal orgánica o de ácido inorgánico farmacéuticamente aceptable de un compuesto de la invención. Las sales farmacéuticamente aceptables representativas incluyen, por ejemplo, sales de metales alcalinos, sales alcalinotérreas, sales de amonio, sales solubles en agua e insolubles en agua, tales como acetato, carbonato, cloruro, gluconato, glutamato, lactato, laurato,
- 15 malato o tartrato.

- El término "profármaco" se refiere a un precursor de un fármaco que es un compuesto que, después de la administración a un paciente, debe experimentar la conversión mediante procesos metabólicos antes de convertirse en un agente farmacológico activo. Los profármacos generalmente son precursores de fármacos que, después de la
- 20 administración a un sujeto y la posterior absorción, se convierten en una especie activa o más activa a través de algún proceso, como la conversión por una vía metabólica. Algunos profármacos tienen un grupo químico presente en el profármaco que lo hace menos activo y/o confiere solubilidad u otra propiedad al fármaco. Una vez que el grupo químico se ha escindido y/o modificado del profármaco, se genera el fármaco activo.
- 25 Los profármacos se convierten en fármacos activos en el cuerpo a través de reacciones enzimáticas o no enzimáticas. Los profármacos pueden proporcionar propiedades fisicoquímicas mejoradas tales como una mejor solubilidad, características de administración mejoradas, tales como dirigirse específicamente a una célula, tejido, órgano o ligando particular, y un valor terapéutico mejorado del fármaco. Los
- 30 profármacos ilustrativos de compuestos de acuerdo con la fórmula general I son ésteres

y amidas, con preferencia alquil ésteres de ácidos grasos. Las formulaciones de profármaco aquí comprenden todas las sustancias que se forman por transformación simple que incluyen hidrólisis, oxidación o reducción enzimática, metabólica o de cualquier otra forma. Un profármaco adecuado contiene, por ejemplo, una sustancia de
5 fórmula general I unida mediante un ligador escindible enzimáticamente (por ejemplo, un grupo carbamato, fosfato, N-glucósido o disulfuro) a una sustancia que mejora la disolución (por ejemplo, tetraetilenglicol, sacáridos, ácidos fórmicos o ácido glucurónico, etc.). Tal profármaco 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
10 general I para obtener el efecto farmacológico deseado.

Algunos compuestos de fórmula general I están comprendidos en forma de racematos, sus enantiómeros y opcionalmente en forma de sus diastereómeros y todas las mezclas posibles de los mismos.

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

Los compuestos obtenidos se pueden separar opcionalmente por métodos conocidos (por ejemplo, *Allinger, N.L. und Elliel E.L. in „Topics in Stereochemistry“ Vol. 6, Wiley Interscience, 1971*) en sus enantiómeros y/o diastereómeros. Un posible método de
20 separación enantiomérica es el uso de cromatografía.

La invención abarca también precursores de los compuestos de fórmula general I. El término "precursor" se refiere a cualquier compuesto que se puede usar para producir los compuestos de Fórmula I. Un ejemplo de precursor puede ser un compuesto que no tiene marca ^{18}F que se agrega en una etapa posterior para proporcionar el compuesto
25 completo.

La invención también se refiere a preparaciones farmacéuticas que contienen una cantidad diagnóstica o terapéuticamente efectiva de los ingredientes activos (compuesto de acuerdo con la invención de fórmula I) junto con portadores sólidos o líquidos, orgánicos o inorgánicos 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 la presente para referirse a los compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosis que están, dentro del
5 alcance del buen criterio médico, adecuados para usar en contacto con los tejidos de un paciente sin toxicidad excesiva, 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
10 perro. El animal puede ser un mamífero tal como un no primate y un primate (por ejemplo, mono y ser humano). En una forma de realización, un paciente es un ser humano.

En general, el compuesto de fórmula I o sus composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía oral o por vía parenteral, habitualmente inyección o infusión.

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

20 La dosis de los compuestos de acuerdo con la invención es determinada por el médico sobre la base de los parámetros específicos del paciente, tales como la edad, peso, sexo, gravedad de la enfermedad, etc. En relación con el tipo de administración, el medicamento se formula adecuadamente, por ejemplo en forma de soluciones o suspensiones, comprimidos o grageas simples, cápsulas de gelatina dura o blanda,
25 supositorios, óvulos, preparaciones para inyección, que se preparan de acuerdo con métodos galénicos comunes.

Los compuestos de acuerdo con la invención se pueden formular, cuando sea apropiado, junto con otras sustancias activas y con excipientes y portadores comunes en composiciones farmacéuticas, por ejemplo - de acuerdo con la preparación que se

va a producir - talco, goma arábica, lactosa, almidón, estearato de magnesio, manteca de cacao, portadores 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 (por ejemplo, aire, oxígeno, dióxido de carbono, etc.), conservantes.

Para producir preparaciones líquidas, se pueden usar aditivos, tales como solución de cloruro de sodio, etanol, sorbitol, glicerina, aceite de oliva, aceite de almendras, propilenglicol o etilenglicol.

Cuando se usan soluciones para infusión o inyección, con preferencia son soluciones o suspensiones acuosas, es posible producirlas antes de usar, por ejemplo, a partir de preparaciones liofilizadas que contienen la sustancia activa como tal o junto con un portador, tales como manitol, lactosa, glucosa, albúmina y similares. Las soluciones preparadas se esterilizan y, cuando sea apropiado, se mezclan con excipientes, por ejemplo, con conservantes, estabilizantes, emulsionantes, solubilizantes, buffers y/o sales para regular la presión osmótica. La esterilización se puede obtener por filtración estéril usando filtros que tienen un tamaño de poro pequeño de acuerdo con la cual la composición se puede liofilizar, cuando sea apropiado. También se pueden agregar pequeñas cantidades de antibióticos para asegurar el mantenimiento de la esterilidad.

Las frases "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" como se usan en la presente significan la cantidad de un compuesto, material o composición que comprende un compuesto de la invención u otro ingrediente activo que es efectivo para producir algún efecto terapéutico deseado en al menos una subpoblación de células en un animal con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Una cantidad terapéuticamente efectiva 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 la prevención de una enfermedad. Utilizado en conexión con un compuesto de la invención, el término puede abarcar una cantidad que mejora la terapia general, reduce o evita síntomas o causas de enfermedad, o mejora la eficacia terapéutica de o sinergias con otro agente terapéutico.

Como se usa en la presente, os términos "tratar" o "tratamiento" pretenden abarcar también el diagnóstico, profilaxis, prevención, terapia y cura.

Los términos "prevenir", "que previene" y "prevención" se refieren a la prevención del inicio, la recurrencia o la diseminación de la enfermedad en un paciente como resultado de la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

Como se indicó anteriormente, los compuestos de acuerdo con la fórmula general I son adecuados para uso como agentes para radiología o como agentes terapéuticos para el tratamiento de células de proliferación rápida, por ejemplo, células de cáncer de próstata que expresan PSMA. De acuerdo con la presente invención, se denominan "radiofármacos".

Los métodos de formación de imágenes preferidos son la tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT).

Por consiguiente, en una forma de realización, se proporciona una composición farmacéutica que incluye un compuesto de fórmula I, una sal, solvato, estereoisómero o tautómero del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, se proporciona una composición farmacéutica, que es adecuada para formación de imágenes in vivo y radioterapia. Las composiciones farmacéuticas adecuadas pueden contener el compuesto de fórmula I en una cantidad suficiente para formación de imágenes, junto con un vehículo radiológico farmacéuticamente aceptable. El vehículo radiológico debe ser adecuado para inyección o aspiración, tal como albúmina sérica humano; soluciones buffer acuosas, por ejemplo, tris(hidrometil)aminometano (y sus sales), fosfato, citrato, bicarbonato, etc; solución salina fisiológica de agua estéril; y soluciones iónicas equilibradas que contienen sales de cloruro y/o dicarbonato o cationes normales de plasma sanguíneo tales como calcio, potasio, sodio y magnesio.

La concentración del agente de formación de imágenes o el agente terapéutico en el vehículo radiológico debería ser suficiente para proporcionar imágenes satisfactorias. Por ejemplo, cuando se usa una solución acuosa, la dosis es de aproximadamente 1.0 a 100 milicurios. Sin embargo, la dosis real administrada a un paciente con fines de formación de imágenes o terapéuticos la determina el médico que administra el tratamiento. El agente de formación de imágenes o el agente terapéutico se deben

administrar para permanecer en el paciente durante aproximadamente 1 hora a 10 días, aunque son aceptables períodos de tiempo más largos y más cortos. Por lo tanto, se pueden preparar ampollas/viales convenientes que contienen de 1 a 10 ml de solución acuosa.

- 5 La formación de imágenes se puede llevar a cabo de la manera normal, por ejemplo, mediante la inyección de una cantidad suficiente de la composición de formación de imágenes para proporcionar una formación de imágenes adecuada y luego escanear con una máquina de formación de imágenes o escaneado adecuada, tal como un tomógrafo o cámara gamma. En ciertas realizaciones, un método para formar imágenes
- 10 de una región en un paciente incluye las etapas de: (i) administrar a un paciente una cantidad diagnósticamente efectiva de un compuesto marcado con un radionúclido; exponer una región del paciente al dispositivo de escaneado y (ii) obtener una imagen de la región del paciente.

La cantidad del compuesto de la presente invención, o su sal, solvato, estereoisómero o tautómero que se administra a un paciente depende de varios factores fisiológicos que

15 el médico utiliza de forma rutinaria, que incluye la naturaleza de las imágenes que se obtendrán, el tejido que es objetivo de las imágenes o la terapia y el peso corporal y el historial médico del paciente que se va examinar con imágenes o tratar usando un radiofármaco.

20 Específicamente, la enfermedad o trastorno proliferativo celular para tratar o formar imágenes usando un compuesto, composición farmacéutica o radiofármaco de acuerdo con esta invención es un cáncer, por ejemplo, cáncer de próstata y/o metástasis de cáncer de próstata en, por ejemplo, pulmón, hígado, riñón, huesos, cerebro, médula espinal, vejiga, etc.

25 La síntesis de los compuestos de la presente invención se lleva a cabo de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica anterior (por ejemplo, Hugenberg et al., J. Med. Chem. 2013, 56, pp. 6858-6870). Los métodos generales para la marcación con ^{18}F de varias macromoléculas se muestran en la figura 1-7. Además, se hace referencia a Schubiger et al., PET Chemistry: The Driving Force in Molecular Imaging, Ernst

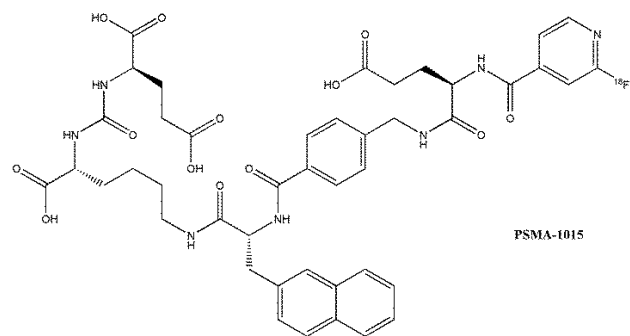
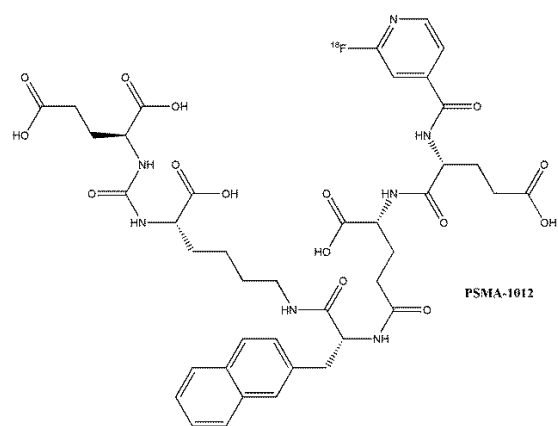
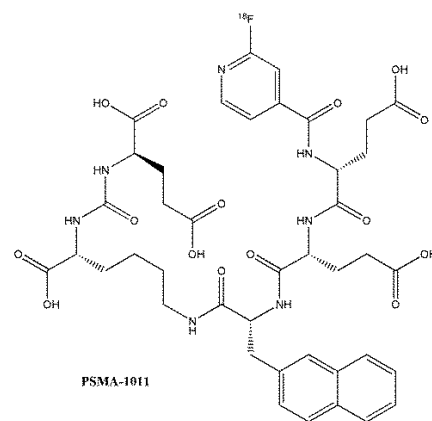
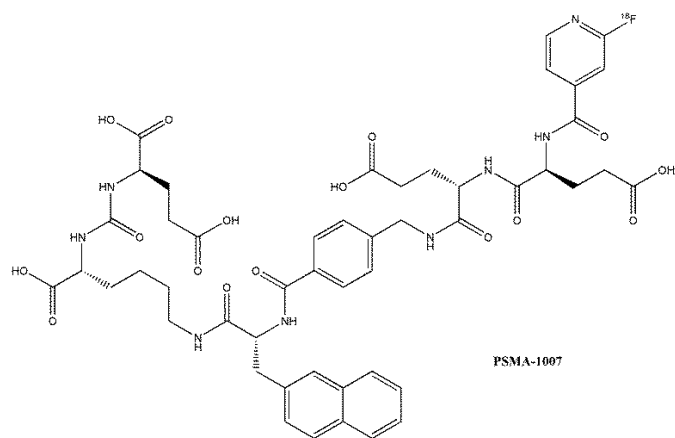
30 Schering Research Foundation, Workshop 62, Springer Verlag, ISSN 0947-6075; Ross

et al., Current Radiopharmaceuticals, 2010, 3, 202-223; Kühnast et al., Current Radiopharm 3, 2010, 174; Bernard-Gautier et al., BioMed Research International, 2014, 1; Maschauer y Prante, BioMed Research International, 2014, 1; Olberg et al., J. Med. Chem., 2010, 53, 1732; Rostovtsev et al., Angew. Chem., 2002, 114, 2708; Smith y Greaney, Org. Lett., 2013, 15, 4826. Por lo tanto, una persona experta en la técnica podría elegir la marcación con ^{18}F correcta de acuerdo con la molécula de partida. La síntesis de las moléculas de ligador específicas se muestra en el documento EP 13004991 al que se hace referencia.

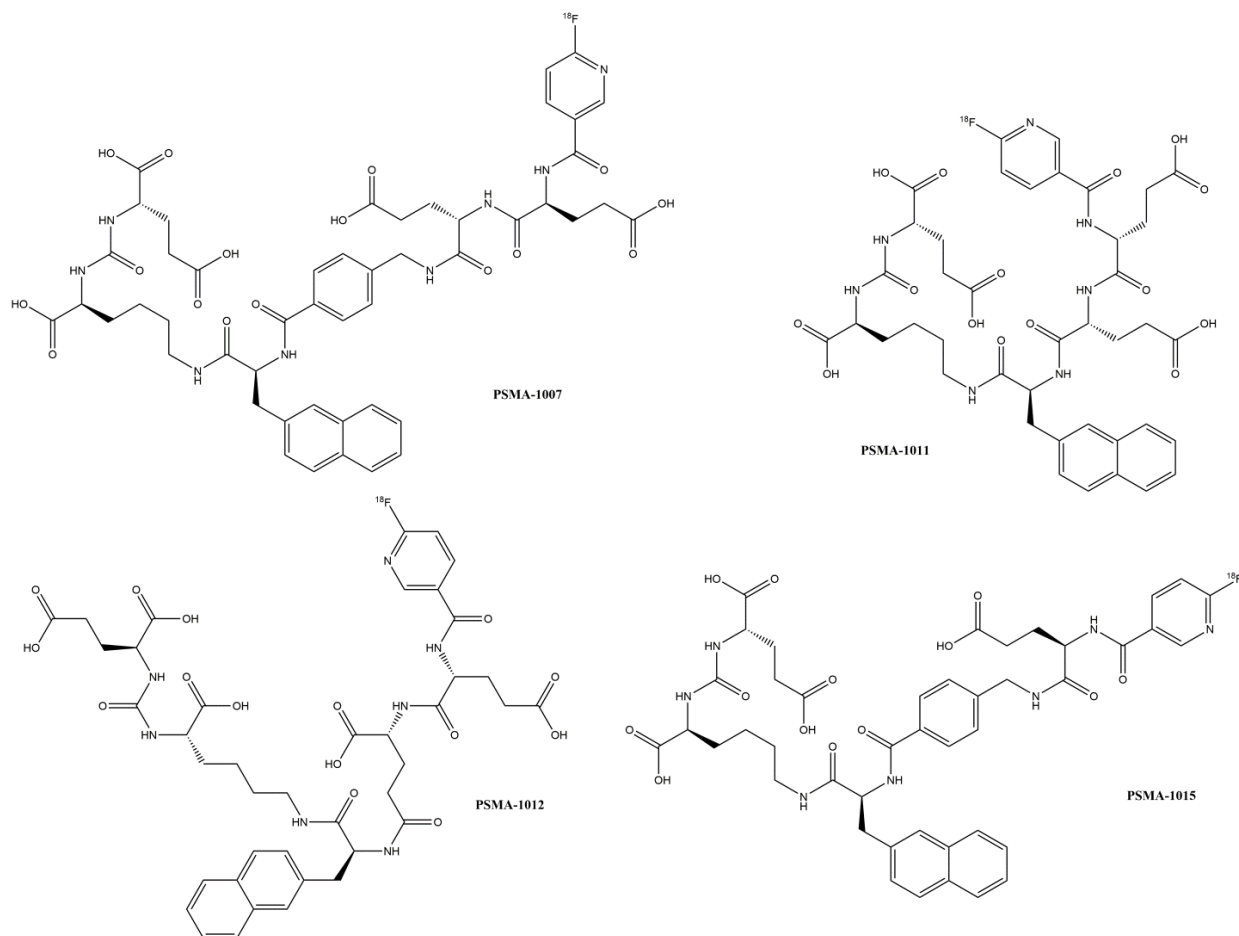
Los compuestos sintetizados se caracterizan químicamente por RP-HPLC, MS y/o RMN.

Los nuevos agentes de formación de imágenes marcados con ^{18}F con modificaciones estructurales en la región del ligador tienen propiedades de direccionamiento de tumor y farmacocinética mejoradas. El farmacóforo presenta tres grupos carboxílicos capaces de interactuar con las cadenas laterales respectivas de PSMA y un oxígeno como parte de la complejación de zinc en el centro activo. Además de estas interacciones obligatorias, los inventores fueron capaces de optimizar las interacciones lipofílicas en la región ligadora en comparación con los compuestos que se describen en el documento EP 14003570.0. Se han añadido otros bloques de construcción hidrófilos al ligador de los compuestos de la presente invención (ligador B), que lleva a otra mejora de la farmacocinética. Estos compuestos se evaluaron en ensayos in vitro (afinidad, internalización) y experimentos in vivo (análisis μPET y distribución de órganos).

Cuatro compuestos preferidos con resultados particularmente prometedores son ^{18}F -PSMA1007, ^{18}F -PSMA1011, ^{18}F -PSMA 1012 y ^{18}F -PSMA 1015:



O



Todos los compuestos se marcaron con flúor-18 a través de éster de TFP de ácido 2-
 5 [18F]-fluoronicotínico con buenos rendimientos radioquímicos. La Tabla A muestra que la afinidad de unión de los inhibidores de PSMA preparados hasta ahora es esencialmente la misma y en el rango típico. Además, todos los compuestos se internalizaron específicamente a 37 °C con valores de captación e internalización de células bastante altos (Tabla B). Por lo tanto, los compuestos investigados exhiben
 10 características in vitro óptimas para imágenes de PET de alto contraste.

Los compuestos de la presente invención se investigaron en estudios de distribución de órganos en ratones que portan un tumor LNCaP (PSMA positivo) con y sin bloqueo de PMPA. Los resultados que se han obtenido a modo de ejemplo con PSMA1007 (esto no
 15 significa que la invención esté limitada de ninguna manera a este compuesto específico solamente) se resumen en las Figuras 8 y 9. La captación tumoral fue de

aproximadamente $8,0 \pm 2,4\%$ ID/g. Debido a que no se observó un bloqueo cuantitativo de la unión en el experimento de bloqueo, se repitió el experimento de distribución del órgano con ratones que porta un tumor PC3 (PSMA negativo; los resultados se muestran en la Figura 8). Aquí, prácticamente no se observó captación tumoral. Por lo tanto, la captación tumoral se considera específicamente. Además, en comparación con la distribución de órganos observada con el compuesto de control PSMA-1003 que se ha descrito en el documento EP 14 003 570.0 y se muestra en la figura 12, el nuevo compuesto PSMA-1007 mostró una captación significativamente reducida en tejido no blanco tal como el hígado y el intestino delgado. Por lo tanto, PSMA-1007 se evaluó adicionalmente en el experimento microPET. Los resultados se muestran en las figuras 10 y 11. El tumor LNCaP se visualizó claramente en este experimento ($SUV_{max} = 3,1$ a 120-140 min p.i.). La captación no deseada en la vesícula biliar puede ser un indicador de metabolitos. En general, la nueva clase de inhibidores de PSMA marcados con flúor-18 mostró un gran potencial como posible trazador para la detección de cáncer de próstata y sus metástasis.

Mediante la aplicación de $[^{18}F]$ PSMA-1007 a un voluntario sano se obtuvieron varias ideas importantes. Primero, la dosis efectiva de un escaneado PET/CT con 200-250 MBq es con 4.3 - 5.4 mSv (2.15 mSv/MBq, Fig. 14). Más del 95% de la actividad de la mezcla de sangre se encuentra en el suero (ausencia o infiltración insignificante de eritrocitos) y más del 90% de eliminación de la mezcla de sangre dentro de las primeras 3 h después de la inyección. Hasta ahora, esos resultados son comparables con otros trazadores de PSMA importantes. Sin embargo, en comparación con los otros trazadores de PSMA conocidos, los compuestos de la presente invención, particularmente $[^{18}F]$ PSMA-1007, proporcionan una depuración hepatobiliar muy única con una depuración muy pequeña a través de la vía renal. Esta excepcional depuración urinaria baja permite una excelente evaluación del lecho prostático. Por lo tanto, los trazadores de acuerdo con la presente invención son perfectamente adecuados para el diagnóstico primario de cáncer de próstata y recidiva local.

Esto también fue demostrado por los resultados del primer estudio en el hombre. Aquí, se observaron excelentes relaciones de tumor a fondo de hasta 10 en el tumor primario

sin ninguna interferencia de la acumulación de trazador en la vejiga. Además, se pudieron detectar metástasis en ganglios linfáticos con un diámetro de hasta 1 mm, que está en el rango de la resolución de los escaneados PET con F-18. La correlación con las muestras obtenidas por el análisis de linfadenectomía pélvica reveló una especificidad del 95%. Por otra parte, las muestras obtenidas de la prostatectomía se analizaron por histopatología, y se reveló una correlación casi perfecta con las imágenes adquiridas por PET. Esos resultados demuestran claramente la viabilidad de la formación de imágenes de cáncer de próstata con los compuestos de la presente invención, particularmente con $[^{18}\text{F}]\text{PSMA-1007}$.

El siguiente ejemplo explica la invención con más detalle, pero no se interpreta que limite la invención de ninguna manera a las realizaciones ejemplificadas solamente.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de precursores y compuestos de referencia fríos de los inhibidores conjugados con ^{18}F

El isocianato del resto glutamilo se generó in situ mediante la adición de una mezcla de 3 mmol de clorhidrato de bis(ter-butil) L-glutamato y 1,5 ml de N-etildiisopropilamina (DIPEA) en 200 ml de CH_2Cl_2 seco a una solución de 1 mmol trifosgeno en 10 ml de CH_2Cl_2 seco a 0 °C durante 4 h. Después de la agitación de la mezcla de reacción durante 1 h a 25 °C, se añadieron 0,5 mmol de la lisina protegida con (2-cloro-tritilresina) ϵ -aliloxycarbonilo inmovilizada con resina en 4 ml de DCM y se hizo reaccionar durante 16 h con agitación suave. La resina se separó por filtración y el grupo protector de aliloxi se eliminó usando 30 mg de tetrakis (trifenil) paladio (0) y 400 μl de morfina en 4 ml de CH_2Cl_2 durante 3 horas.

El siguiente acoplamiento de los "aminoácidos ligadores" (como se define en la Fórmula I y el Esquema 1 que se muestra anteriormente) se realizó en forma escalonada usando 2 mmol de ácido Fmoc protegido, 1,96 mmol de HBTU y 2 mmol de N-etildiisopropilamina en un volumen final de 4 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). La purificación se realizó usando RP-HPLC y el producto purificado se analizó mediante RP-HPLC analítica y MALDI-MS.

Para la preparación de los compuestos de referencia no radiactivos se acoplaron 50 mg de HBTU/DIPEA (0,98 y 1 equiv), ácido 6-fluoronotínico-3 activado en un volumen final de 4 ml de DMF y se agitó durante 1 ha temperatura ambiente. el producto fue el escindido de la resina como se describió anteriormente.

En algunas preparaciones, se unieron restos reactivos de marca ^{18}F (por ejemplo, ácido pent-4-inoico o ácido (Boc-aminooxi) acético) al grupo amino terminal para la posterior marcación con ^{18}F .

Ejemplo 2: Producción y activación del ^{18}F fluoruro

Preparación y activación del ^{18}F fluoruro

El flúor-18 se produjo mediante la irradiación de agua enriquecida con ^{18}O con protones de 16,5 MeV utilizando la reacción nuclear $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$. Las irradiaciones se realizaron con el ciclotrón Scanditronix MC32NI en el departamento de Química radiofarmacéutica (E030) en el Centro Alemán de Investigación del Cáncer en Heidelberg.

Después de la transferencia del agua irradiada a un sistema automatizado (Trasis All In One 32), el ^{18}F F⁻ se separó del ^{18}O]H₂O al pasar a través de un cartucho de intercambio aniónico previamente acondicionado (5 ml de K₂CO₃ y 10 ml de agua) (Waters AccelTM Plus QMA Cartridge light) y posteriormente se eluyó con una mezcla de 800 µl de acetonitrilo y 150 µl de solución de bicarbonato de tetrabutilamonio (320 mM en agua) .La mezcla se evaporó a sequedad a una temperatura de 100 °C bajo una corriente de nitrógeno . Esta destilación se repitió posteriormente dos veces mediante la adición de 1,8 ml de acetonitrilo para cada etapa. Después de aplicar un vacío máximo alcanzable al residuo durante 5 minutos a 100 °C y posterior enfriamiento a 50 |C, el residuo seco se disolvió en 2 ml de ter-butanol/acetonitrilo (8: 2) y se usó para las reacciones de marcación.

Alternativamente, el sistema también se usó con el sistema de activación Kryptofix® 2.2.2/K₂CO₃ clásico (20 mg 2.2.2 + 28 µl de K₂CO₃ 1 M) en acetonitrilo. Además, el

solvente para disolver el $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ activado se cambió a DMF seco, DMSO o acetonitrilo para algunos experimentos.

Ejemplo 3: Radiosíntesis de tetrafluorofenil éster del ácido 6- $[^{18}\text{F}]$ Fluoronicotínico ($[^{18}\text{F}]\text{FN-TFP}$)

5 A 10 mg de trifluorometanosulfonato de N, N, N-Trimetil-5 - ((2,3,5,6-tetrafluorofenoxi)-carbonil) piridin-2-aminio (preparado como se describe en Olberg et al. J. Med. Chem., 2010, 53, 1732) se añadió 1 ml de ter-butanol/acetonitrilo (8: 2) que contiene el $[^{18}\text{F}]$ KF-Kryptofix 2.2.2 komplex seco (0,1-10GBq ^{18}F) y la mezcla se calentó a 40 °C. Después
10 de 10 minutos, la mezcla se diluyó con 3 ml de agua y el producto se cargó en un Oasis MCX Plus Sep-Pak preacondicionado (Waters). El cartucho se enjuagó con 10 ml de agua y el tetrafluorofenil éster de ácido 6- $[^{18}\text{F}]$ Fluoronicotínico purificado se eluyó de vuelta al recipiente de reacción usando 2 ml de agua/acetonitrilo (7:13). Para lograr una mayor concentración de actividad se obtuvo una elución fraccionada en algunos casos.
15 Por lo tanto, el cartucho cargado se enjuagó con 500 µl de solvente, que se descartaron, y luego se eluyeron con 400-800 µl de solvente para reacciones posteriores. Por lo general, más del 50% de la actividad inicial se eluyó con la segunda fracción.

Ejemplo 4: PSMA-1007

La síntesis del precursor y la referencia fría se realizó como se describe en el ejemplo 1.

Radiosíntesis de $[^{18}\text{F}]\text{PSMA-1007}$

25 200 µl de ($[^{18}\text{F}]\text{FN-TFP}$) se añadieron a 50 µl de una solución de 2 mg/ml de PSMA-1007-VL en DMSO. Luego se añadieron 50 µl de buffer (buffer fosfato 0,2 M, pH 8,0) y la mezcla se calentó a 60 °C durante 20 minutos. Los productos se separaron por radio-HPLC semipreparativa y se identificaron por radio-HPLC analítica y comparación de los tiempos de retención con los respectivos compuestos de referencia no radiactivos.

PSMA1007-VL (Precursor):

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(Bn)-(Glu)-(Glu); (C₄₃H₅₃N₇O₁₅; 907,93g/mol)

particularmente (Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(Bn)-(L-Glu)-(L-Glu)

MS (MALDI): m/z = 908,7 [M + H⁺]⁺

5

PSMA-1007

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(Bn)-(Glu)-(Glu)-FN; C₄₉H₅₅FN₈O₁₆; (1031 g/mol)

particularmente (Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(Bn)-(L-Glu)-(L-Glu)-FN;

MS (MALDI): m/z = 1032,1 [M + H⁺]⁺

10

[¹⁸F]PSMA-1007

RCA: ca. 6 %

HPLC (Gradiente: 5% A/95 % B – 95 % A/5 % B en 12,5 min; Flujo: 3 ml/min; Columna: Merck Chromolith® Performance RP-18e 100-4,6 mm; Solvente A: Acetonitrilo, Solvente B: 0,1% TFA acuoso): t_{ret}: 4,56 min (t_{muerto}: 0,56 min)

15

Ejemplo 5: PSMA-1011

La síntesis del precursor y la referencia fría se realizó como se describe en el ejemplo 1. La síntesis [¹⁸F]PSMA-1011 se realizó como se describe en el ejemplo 4.

20 PSMA-1011-VL (precursor):

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Naftilalanina)-(Glu)-(Glu); C₃₅H₄₆N₈O₁₄ (774,78 g/mol)

MS (MALDI): m/z = 775,3 [M + H⁺]⁺

PSMA-1011:

25 (Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Naftilalanina)-(Glu)-(Glu)-FN; C₄₁H₄₈FN₇O₁₅(897,86 g/mol)

MS (MALDI): m/z = 898,3 [M + H⁺]⁺

[¹⁸F]PSMA-1011:

RCA: ca. 7 %

HPLC (Gradiente: 5% A/95 % B – 50 % A/50 % B en 10,0 min; Flujo: 3 ml/min;
5 Columna: Merck Chromolith® Performance RP-18e 100-4,6 mm; Solvente A: Acetonitrilo, Solvente B: 0,1 % TFA acuoso): t_{ret} : 5,72 min (t_{muerto} : 0,56 min)

Ejemplo 6: PSMA-1012

La síntesis del precursor y la referencia fría se realizó como se describe en el ejemplo

10 1. La síntesis [¹⁸F]PSMA-1012 se realizó como se describe en el ejemplo 4.

PSMA-1012-VL (precursor):

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Naftilalanina)-(γGlu)-(Glu); C₃₅H₄₆N₈O₁₄ (774,78 g/mol)

MS (MALDI): $m/z = 775,0 [M + H^+]^+$

15

PSMA-1012:

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Naftilalanina)-(γGlu)-(Glu)-FN; C₄₁H₄₈FN₇O₁₅(897,86 g/mol)

MS (MALDI): $m/z = 897,9 [M + H^+]^+$

20 [¹⁸F]PSMA-1012:

RCA: ca. 4 %

HPLC (Gradiente: 5% A/95 % B – 50 % A/50 % B en 10,0 min; Flujo: 3 ml/min;
Columna: Merck Chromolith® Performance RP-18e 100-4,6 mm; Solvente A: Acetonitrilo, Solvente B: 0,1 % TFA acuoso): t_{ret} : 5,61 min (t_{muerto} : 0,56 min)

25

Ejemplo 7: PSMA-1015

La síntesis del precursor y la referencia fría se realizó como se describe en el ejemplo 1. La síntesis [^{18}F]PSMA-1015 se realizó como se describe en el ejemplo 4.

PSMA-1015-VL (precursor):

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(Bn)-(Glu); $\text{C}_{38}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_{12}$ (778,80 g/mol)

5 MS (MALDI): $m/z = 779,4 [\text{M} + \text{H}^+]^+$

PSMA-1015:

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(Bn)-(Glu)-FN; $\text{C}_{44}\text{H}_{48}\text{FN}_7\text{O}_{13}$ (901,89 g/mol)

MS (MALDI): $m/z = 902,5 [\text{M} + \text{H}^+]^+$

10

[^{18}F]PSMA-1015:

RCA: ca. 7 %

HPLC (Gradiente: 5% A/95 % B – 50 % A/50 % B en 10,0 min; Flujo: 3 ml/min; Columna: Merck Chromolith® Performance RP-18e 100-4,6 mm; Solvente A: Acetonitrilo, Solvente B: 0,1 % TFA acuoso): t_{ret} : 6,48 min (t_{muerto} : 0,56 min)

15

Ejemplo 8: Síntesis de [^{18}F]FN-TFP seco

La radiosíntesis se realizó como se describe en el ejemplo 3 hasta la elución del [^{18}F]FN-TFP del cartucho. Después de lavar el cartucho con 10 ml de agua (ejemplo 3), el cartucho se secó por soplado con 20 - 40 ml de aire. A continuación, el cartucho MCX se conectó a un cartucho de secado SepPak SodSulf y el producto se eluyó con 2 ml de acetonitrilo seco. Para lograr una mayor concentración de actividad se realizó una elución fraccionada en algunos casos. Por lo tanto, el cartucho MCX cargado se enjuagó con 500 μl de solvente (después de soplar el cartucho seco), que se desecharon, y luego el cartucho de secado se conectó al cartucho MCX y el producto se eluyó con 0.8-1.2 ml de acetonitrilo para reacciones posteriores. Usualmente, más del 50% de la actividad inicial se eluyó con la segunda fracción.

20

25

Ejemplo 9: PSMA-1018

La síntesis del precursor y la referencia fría se realizó como se describe en el ejemplo 1.

Radiosíntesis de [¹⁸F]PSMA-1018

- 5 200 µl de [¹⁸F]FN-TFP seco (ejemplo 8) se añadieron a 50 µl de una solución de 4 mg/ml de PSMA-1018-VL en DMSO. Luego se añadieron 10 µl de DIPEA y la mezcla se calentó a 60 °C durante 20 minutos. Luego la mezcla de reacción se acidificó mediante la adición de 10 µl TFA, los productos se separaron por radio-HPLC semipreparativa y se identificaron por radio-HPLC analítica y las comparación de los tiempos de retención
10 con los respectivos compuestos de referencia no radioactivos.

PSMA-1018-VL (precursor):

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(Bn)-(Glu)-(Glu)-(Glu); C₄₈H₆₀N₈O₁₈ (1037,03 g/mol)

MS (MALDI): m/z = 1037,6 [M + H⁺]⁺

- 15 PSMA-1018:

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(Bn)-(Glu)-(Glu)-(Glu)-FN; C₅₄H₆₂FN₉O₁₉ (1160,12 g/mol)

MS (MALDI): m/z = 1160,8 [M + H⁺]⁺

[¹⁸F]PSMA-1018:

- 20 RCA:ca. 20 %

HPLC (Gradiente: 5% A/95 % B – 95 % A/5 % B en 10,0 min; Flujo: 3 ml/min; Columna: Merck Chromolith® Performance RP-18e 100-4,6 mm; Solvente A: Acetonitrilo, Solvente B: 0,1 % TFA acuoso): t_{ret}: 3,87 min (t_{muerto}: 0,56 min)

- 25 **Ejemplo 10: PSMA-1019**

La síntesis del precursor y la referencia fría se realizó como se describe en el ejemplo 1. La síntesis [^{18}F]PSMA-1019 se realizó como se describe en el ejemplo 9.

PSMA-1019-VL (precursor):

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(Chx)-(Glu)-(Glu); $\text{C}_{43}\text{H}_{59}\text{N}_7\text{O}_{15}$ (913,97 g/mol)

5 MS (MALDI): $m/z = 914,4 [\text{M} + \text{H}^+]^+$

PSMA-1019:

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(Chx)-(Glu)-(Glu)-FN; $\text{C}_{49}\text{H}_{61}\text{FN}_8\text{O}_{16}$ (1037,05 g/mol)

MS (MALDI): $m/z = 1037,7 [\text{M} + \text{H}^+]^+$

10

[^{18}F]PSMA-1019:

RCA:ca. 47 %

HPLC (Gradiente: 5% A/95 % B – 95 % A/5 % B en 12,5 min; Flujo: 3 ml/min; Columna: Merck Chromolith® Performance RP-18e 100-4,6 mm; Solvente A: Acetonitrilo,

15 Solvente B: 0,1 % TFA acuoso): t_{ret} : 4,43 min (t_{muerto} : 0,56 min)

Ejemplo 11: PSMA-1020

La síntesis del precursor y la referencia fría se realizó como se describe en el ejemplo 1. La síntesis [^{18}F]PSMA-1020 se realizó como se describe en el ejemplo 9.

20 PSMA-1020-VL (precursor):

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(γGlu)-(Glu)-(Glu); $\text{C}_{40}\text{H}_{53}\text{N}_7\text{O}_{17}$ (903,89 g/mol)

MS (MALDI): $m/z = 904,9 [\text{M} + \text{H}^+]^+$

PSMA-1020:

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(γGlu)-(Glu)-(Glu)-FN; C₄₆H₅₅FN₈O₁₈ (1026,97 g/mol)

MS (MALDI): m/z = 1027,9 [M + H⁺]⁺

[¹⁸F]PSMA-1020:

5 RCA: ca. 60 %

HPLC (Gradiente: 5% A/95 % B – 95 % A/5 % B en 12,5 min; Flujo: 3 ml/min; Columna: Merck Chromolith® Performance RP-18e 100-4,6 mm; Solvente A: Acetonitrilo, Solvente B: 0,1 % TFA acuoso): t_{ret}: 6,48 min (t_{muerto}: 0,56 min)

10 **Ejemplo 12: PSMA-1022**

La síntesis del precursor y la referencia fría se realizó como se describe en el ejemplo 1. La síntesis [¹⁸F]PSMA-1022 se realizó como se describe en el ejemplo 9.

PSMA-1022-VL (precursor):

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(γGlu)-(γGlu); C₃₅H₄₆N₈O₁₄ (774,78 g/mol)

15 MS (MALDI): m/z = 775,4 [M + H⁺]⁺

PSMA-1022:

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(γGlu)-(γGlu)-FN; C₄₁H₄₈FN₇O₁₅(897,86 g/mol)

MS (MALDI): m/z = 898,8 [M + H⁺]⁺

20

[¹⁸F]PSMA-1022:

RCA:ca. 29 %

HPLC (Gradiente: 5% A/95 % B – 95 % A/5 % B en 10,0 min; Flujo: 3 ml/min; Columna: Merck Chromolith® Performance RP-18e 100-4,6 mm; Solvente A: Acetonitrilo, Solvente B: 0,1 % TFA acuoso): t_{ret} : 3,92 min (t_{muerto} : 0,56 min)

5 Ejemplo 13: PSMA-1023

La síntesis del precursor y la referencia fría se realizó como se describe en el ejemplo 1. La síntesis [^{18}F]PSMA-1023 se realizó como se describe en el ejemplo 9

PSMA-1023-VL (precursor):

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(Bn)-(D-Glu)-(D-Glu); $\text{C}_{43}\text{H}_{53}\text{N}_7\text{O}_{15}$ (907,93 g/mol)

10 MS (MALDI): $m/z = 907,8$ [$\text{M} + \text{H}^+$] $^+$

PSMA-1023:

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(Bn)-(D-Glu)-(D-Glu)-FN; $\text{C}_{49}\text{H}_{55}\text{FN}_8\text{O}_{16}$ (1031,00 g/mol)

MS (MALDI): $m/z = 1031,8$ [$\text{M} + \text{H}^+$] $^+$

15

[^{18}F]PSMA-1023:

RCA: ca. 24 %

HPLC (Gradiente: 5% A/95 % B – 50 % A/50 % B en 10,0 min; Flujo: 3 ml/min; Columna: Merck Chromolith® Performance RP-18e 100-4,6 mm; Solvente A: Acetonitrilo, Solvente B: 0,1 % TFA acuoso): t_{ret} : 3,87 min (t_{muerto} : 0,56 min)

20

Ejemplo 14: PSMA-1024

La síntesis del precursor y la referencia fría se realizó como se describe en el ejemplo 1. La síntesis [^{18}F]PSMA-1024 se realizó como se describe en el ejemplo 9.

PSMA-1024-VL (precursor):

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(Bn)-(D-Glu)-(Glu); C₄₃H₅₃N₇O₁₅(907,93 g/mol)

MS (MALDI): m/z = 908,6 [M + H⁺]⁺

5 PSMA-1024:

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(Bn)-(D-Glu)-(Glu)-FN; C₄₉H₅₅FN₈O₁₆ (1031,00 g/mol)

MS (MALDI): m/z = 1031,5 [M + H⁺]⁺

[¹⁸F]PSMA-1024:

10 RCA:ca. 27 %

HPLC (Gradiente: 5% A/95 % B – 95 % A/5 % B en 10,0 min; Flujo: 3 ml/min; Columna: Merck Chromolith® Performance RP-18e 100-4,6 mm; Solvente A: Acetonitrilo, Solvente B: 0,1 % TFA acuoso): t_{ret}: 3,85 min (t_{muerto}: 0,56 min)

15 **Ejemplo 15: PSMA-1025**

La síntesis del precursor y la referencia fría se realizó como se describe en el ejemplo 1. La síntesis [¹⁸F]PSMA-1025 se realizó como se describe en el ejemplo 9.

PSMA-1025-VL (precursor):

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(Bn)-(Gla); C₃₉H₄₆N₆O₁₄(822,21 g/mol)

20 MS (MALDI): m/z = 822,8 [M + H⁺]⁺

PSMA-1025:

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(Bn)-(Gla)-FN; C₄₉H₅₅FN₈O₁₆ (945,32 g/mol)

MS (MALDI): m/z = 946,0 [M + H⁺]⁺

[¹⁸F]PSMA-1025:

RCA:ca. 24 %

HPLC (Gradiente: 5% A/95 % B – 95 % A/5 % B en 12,5 min; Flujo: 3 ml/min; Columna:

5 Merck Chromolith® Performance RP-18e 100-4,6 mm; Solvente A: Acetonitrilo, Solvente B: 0,1 % TFA acuoso): t_{ret}: 4,51 min (t_{muerto}: 0,56 min)

Ejemplo 16: PSMA-1026

La síntesis del precursor y la referencia fría se realizó como se describe en el ejemplo

10 1. La síntesis [¹⁸F]PSMA-1026 se realizó como se describe en el ejemplo 9.

PSMA-1026-VL (precursor):

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(Bn)-(Sala); C₃₆H₄₄N₆O₁₃S(800,83 g/mol)

MS (MALDI): m/z = 801,8 [M + H⁺]⁺

15 PSMA-1026:

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(Bn)-(Sala)-FN; C₄₂H₄₆FN₇O₁₄S (923,92 g/mol)

MS (MALDI): m/z = 924,7 [M + H⁺]⁺

[¹⁸F]PSMA-1026:

20 RCA:ca. 57 %

HPLC (Gradiente: 5% A/95 % B – 95 % A/5 % B en 12,5 min; Flujo: 3 ml/min; Columna:

Merck Chromolith® Performance RP-18e 100-4,6 mm; Solvente A: Acetonitrilo, Solvente B: 0,1 % TFA acuoso): t_{ret}: 4,03 min (t_{muerto}: 0,56 min)

Ejemplo 17: PSMA-1027

La síntesis del precursor y la referencia fría se realizó como se describe en el ejemplo 1. La síntesis [^{18}F]PSMA-1027 se realizó como se describe en el ejemplo 9.

PSMA-1027-VL (precursor):

5 (Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(Bn)-(Sala)-(Sala); $\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{S}_2$ (951,97 g/mol)

MS (MALDI): $m/z = 952,7 [\text{M} + \text{H}^+]^+$

PSMA-1027:

(Glu)-(Urea)-(Lys)-(2-Nal)-(Bn)-(Sala)-(Sala)-FN; $\text{C}_{45}\text{H}_{51}\text{FN}_8\text{O}_{18}\text{S}_2$ (1075,06 g/mol)

10 MS (MALDI): $m/z = 1075,8 [\text{M} + \text{H}^+]^+$

[^{18}F]PSMA-1027:

RCA:ca. 62 %

HPLC (Gradiente: 5% A/95 % B – 95 % A/5 % B en 10,0 min; Flujo: 3 ml/min; Columna:
15 Merck Chromolith® Performance RP-18e 100-4,6 mm; Solvente A: Acetonitrilo,
Solvente B: 0,1 % TFA acuoso): t_{ret} : 3,10 min (t_{muerto} : 0,56 min)

Ejemplo 18: Cultivo celular

Para estudios de unión y experimentos in vivo, se cultivaron células LNCaP (lesión
20 metastásica del adenocarcinoma prostático humano, ATCC CRL-1740) en medio RPMI
suplementado con suero de carnero fetal 10% y Glutamax (PAA, Austria). Durante el
cultivo celular, las células se cultivaron a 37 °C en una incubadora con aire
humidificado, equilibrado con CO_2 5%. Las células se recogieron usando tripsina- ácido
etilendiaminotetraacético (tripsina-EDTA, 0,25% de tripsina, 0,02% de EDTA, todo de
25 PAA, Austria) y se lavó con PBS.

Ejemplo 19: Unión e internalización celular

El ensayo de unión celular competitiva y los experimentos de internalización se realizaron como se describió previamente (Eder et al. *Bioconjugate Chem*, 2012, 23 (4), 688–697). Brevemente, las células respectivas (10^5 por pocillo) se incubaron con el radioligando ([Glu-urea-Lys (Ahx)] 2-HBED-CC marcado con ^{68}Ga (Schafer et al. *EJNMMI Research* **2012**, 2:23doi:10,1186/2191-219X-2-23))) 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 multiscreen (Millipore, Billerica, MA). La radioactividad unida a la célula se midió usando un contador gamma (Packard Cobra II, GMI, Minnesota, USA). La concentración inhibidora 50% (IC_{50}) se calculó mediante el ajuste de datos usando un algoritmo de regresión no lineal (GraphPad Software). Los experimentos se realizaron tres veces. Se hace referencia a la Tabla A a continuación.

Para determinar la captación e internalización celular específica, se sembraron 10^5 células en placas de cultivo celular de 24 pocillos recubiertas con poli-L-lisina 24 h antes de la incubación. Después del lavado, las células se incubaron con 30 nM de los compuestos radiomarcados durante 45 min a 37°C . La captación celular específica se determinó mediante bloqueo competitivo con ácido 2- (fosfonometil) pentanodioico (concentración final 500 μM , PMPA, Axxora, Loerrach, Alemania). La captación celular se terminó lavando 3 veces con 1 ml de PBS helado. Posteriormente, las células se incubaron dos veces con 0,5 ml de glicina-HCl en PBS (50 mM, pH = 2,8) durante 5 minutos para eliminar la fracción unida a la superficie. Las células se lavaron con 1 ml de PBS helado y se lisaron usando NaOH 0,3 N (0,5 ml). Las fracciones unidas a la superficie y las internalizadas se midieron en un contador gamma. La captación celular se calculó como el porcentaje de la radioactividad añadida inicialmente unida a 10^5 células [% ID/ 10^5 células]. Los principales resultados se dan en la Tabla B.

Tabla A: Ensayo de afinidad de unión

Compuesto	IC_{50} [nM]
-----------	-----------------------

PSMA-1007	5
PSMA-1011	7
PSMA-1012	7
PSMA-1015	4
PSMA-1018	14
PSMA-1019	12
PSMA-1020	9
PSMA-1022	8
PSMA-1023	8
PSMA-1024	8
PSMA-1025	9
PSMA-1026	14
PSMA-1027	7

Tabla B: Internalización específica

Compuesto	Superficie celular [%ID/10 ⁵ células]	Internalizadas [%ID/10 ⁵ células]	Fracción internalizada [%]*
PSMA-1007	2,7	6,5	71
PSMA-1011	4,1	0,7	15
PSMA-1012	6,9	2,7	28
PSMA-1015	14,3	6,0	30
PSMA-1018	1,1	0,9	45

PSMA-1019	5,5	1,9	26
PSMA-1020	6,8	1,5	18
PSMA-1022	3,5	1,0	22
PSMA-1023	6,5	3,2	33
PSMA-1024	5,3	2,1	28
PSMA-1025	4,3	3,1	42
PSMA-1026	1,3	1,3	50
PSMA-1027	0,9	1,4	60

*(actividad internalizada/actividad total)*100

Ejemplo 20: MicroPET

Para los estudios microPET, se inyectaron 10 - 25 MBq de los compuestos radiomarcados en un volumen de 0,10 ml (60 pmol) a través de una vena lateral de la cola en ratones portadores de xenoinjertos tumorales LNCaP. Los animales anestesiados (sevoflurano 2%, Abbott, Wiesbaden, Alemania) se colocaron en posición prona en el escáner PET de animales pequeños Inveon (Siemens, Knoxville, Tenn, USA) para realizar escaneados de microPET dinámicos. Los resultados se muestran en las Figuras 10 y 11.

Ejemplo 21: Unión y estabilidad plasmática

Para la determinación de la unión del plasma, 3 µl de una solución c.a. 6 µmolar de [¹⁸F]PSMA se añadieron a 300 µl de suero humano AB y se incubó a 37 ° C durante 1 h. Posteriormente, la mezcla del producto se analizó por cromatografía de exclusión por tamaño.

No se observó unión al plasma con ninguno de los compuestos.

Para la determinación de la estabilidad del plasma, 50 µl de de una solución c.a. 6 µmolar de [¹⁸F]PSMA se añadieron a 450 µl de suero humano AB y se incubó a 37 °C. En 1,2 y 4 h se prepararon muestras. Por lo tanto, se añadieron 100 µl de la mezcla de trazador/plasma a 100 µl de acetonitrilo. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a

13000 rpm durante 3 minutos. Se añadieron 100 µl del sobrenadante a 100 µl de acetonitrilo, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos, se separó el líquido de cualquier sólido residual y se analizó mediante HPLC.

Todos los compuestos fueron estables en plasma humano a 37 ° C durante al menos 4 horas.

Ejemplo 22: Experimentos in vivo

Para los experimentos in vivo, los ratones BALB/c nu/nu de 8 semanas de edad se inocularon por vía subcutánea en el tronco derecho con 5×10^6 células LNCaP o PC3 en Matrigel 50%. Cuando el tamaño del tumor fue de aproximadamente 1 cm³, el compuesto radiomarcado se inyectó a través de la vena de la cola (aproximadamente 30 MBq, 60 pmol para la obtención de imágenes por µPET, aproximadamente 1 MBq, 60 pmol para la distribución en el órgano).

Distribución en el órgano

Los compuestos marcados con F-18 se inyectaron a través de la vena de la cola (1-2 MBq por ratón, 60 pmol). A 1 h después de la inyección, los animales se sacrificaron. Los órganos de interés se disecaron, se secaron y se pesaron. La radioactividad se midió con un contador gamma (Packard Cobra II, GMI, Minnesota, USA) y se calculó como % de ID/g. Los principales resultados se muestran en las Figuras 8 y 9.

Los compuestos PSMA 1003 y PSMA 1009 son para comparación y se muestran en la Fig. 12 y 13.

Ejemplo 23: [¹⁸F]PSMA-1007 para aplicación humana

Se produjo [¹⁸F]PSMA-1007 por conjugación de [¹⁸F] FN-TFP seco (Ejemplo 8) a PSMA1007-VL (Ejemplo 4) en condiciones secas (análogamente al Ejemplo 9) en un módulo de síntesis automática (Trasis AllInOne) y se purificó mediante HPLC semipreparativa. La radio-HPLC se realizó para determinar la identidad química y la pureza química y radioquímica de [¹⁸F] PSMA-1007. Los solventes residuales se determinaron mediante cromatografía de gases. La pureza del radionúclido se controló mediante la medición de la vida media. La solución del producto se analizó por

esterilidad, endotoxinas bacterianas (prueba LAL), pH, carencia de color y partículas. La integridad del filtro estéril después de la filtración se examinó usando la prueba de punto de burbuja.

Ejemplo 24: Aplicación de [^{18}F]PSMA-1007 a un voluntario sano

- 5 Al sujeto sano se le inyectó una actividad total de 300 MBq y posteriormente se realizaron escaneados PET en un escáner Biograph mCT Flow (Siemens, Erlangen, Alemania) en tres bloques. El bloque 1 contenía PET-1 (inicio 5 min pi) a PET-7 (que termina 140 min pi), el bloque 2 contenía PET-8 (inicio 180 min pi) y PET-9 (240-270 min pi), bloque 3 contenía PET-10 (440-480 min pi). Se realizó una TC de dosis baja no
10 potenciada (estimación de 1,43 mSv, respectivamente) para la corrección de la atenuación al comienzo de cada bloque, seguida de escaneados de emisiones en serie sin mover al voluntario entre ellos.

- Riñones, hígado, bazo, corazón entero, intestino grueso superior e inferior, glándulas parótidas, glándulas submandibulares y vejiga urinaria se segmentaron en volúmenes
15 de interés (VOI) usando un porcentaje del umbral máximo entre 20% y 30% usando la CT correspondiente como guía y luego se calcularon las curvas de tiempo-actividad (TAC) para todos los órganos. La TAC para la médula ósea roja se derivó de las muestras de sangre venosa y luego se calculó la dosis para la médula ósea roja (S. Shen et al., *JNM* 2002, 43, 1245-1253; G. Sgouros et al., *JNM* 1993, 34, 689-694). La
20 TAC para el contenido de la vejiga urinaria fue una combinación de la actividad estimada en el VOI de la vejiga urinaria en la PET y la actividad medida en la orina vaciada. El ajuste de curva se aplicó a todas las TAC. Los riñones, las glándulas salivales, el intestino grueso superior e inferior y el corazón se ajustaron con una función biexponencial. Para el hígado, el bazo y el contenido de la vejiga urinaria, se
25 realizó un ajuste monoexponencial a los tres últimos puntos de tiempo.

- Los cálculos de la dosis absorbida y efectiva se realizaron utilizando el paquete IDAC 1.0 endosado por la ICRP que está integrado en QDOSE. Además, los tiempos de residencia de todos los órganos fuente incluidos y el resto del cuerpo se exportaron como un archivo de caso OLINDA para el cálculo de la dosis (OLINDA 1.1). Las dosis
30 absorbidas en las glándulas salivales (parótida y glándulas submandibulares) se

determinaron usando el modelo esférico. Las masas de órganos para las glándulas salivales se estimaron con 25 g para una parótida y 12,5 g para una glándula submandibular (publicación ICRP 89). Los resultados se resumen en las Figuras 14 - 16.

5

Ejemplo 25: Aplicación de [¹⁸F]PSMA-1007 en un pacientes que padecen de cáncer de próstata

Se inyectaron 100 - 360 MBq de [¹⁸F]-PSMA-1007 a diez pacientes (edad 60 - 80 años) que padecían cáncer de próstata de alto riesgo recientemente diagnosticado con una puntuación de Gleason de 7 - 9 y niveles iniciales de PSA de 5 - 90 ng/ml. 1007 y posteriormente se realizaron los escaneados de PET en un escáner Biograph mCT Flow (Siemens, Erlangen, Alemania) a 1 y 3 h pi. Los resultados se representan en las Figuras 17 y 18 como valores medios de SUV_{media} y SUV_{max}, respectivamente. Las imágenes obtenidas con los escaneados PET se ejemplifican en las Figuras 19 y 20 como proyecciones de intensidad máxima.

Ocho de los pacientes se sometieron a prostatectomía radical con linfadenectomía pélvica extendida. Los análisis de la muestra de prostatectomía realizaron en forma cegada a los datos de PET bajo la supervisión de uropatólogos especializados, de acuerdo con los estándares de la Sociedad Internacional de Patología Urológica (T.H. van der Kwast et al. *Mod. Pathol.* 2011, 24, 16-25). Las secciones representativas se tiñeron mediante inmunohistoquímica. Las secciones se desparafinaron en xileno y se rehidrataron en una serie graduada de etanol. La recuperación de antígenos se realizó con un horno a vapor usando un buffer de recuperación (Target Retrieval Solution, Dako). Se usó un anticuerpo monoclonal de ratón contra PSMA (clon 3E6, Dako) a una dilución 1: 100 y se incubó durante la noche a 4 °C y posteriormente se realizó la inmunodetección usando el kit de detección Histostain-Plus (Invitrogen). Las secciones teñidas se escanearon utilizando un sistema de escaneado Nanozoomer 2.0-HT (Hamamatsu Photonics) para generar imágenes digitales completas. La tinción reveló una correlación casi perfecta con el escaneado PET, como se ejemplifica en la Figura 21.