

LIGANDOS DE ANTÍGENO DE MEMBRANA ESPECÍFICO DE PRÓSTATA (PSMA) Y SUS USOS

Campo técnico.

5 La presente divulgación se refiere a ligandos del antígeno de membrana específico de próstata (PSMA, conforme a sus siglas en inglés). En particular, la divulgación se refiere a ligandos de PSMA que tienen un resto glutamato–urea–lisina (GUL) y un agente quelante que puede comprender un radiometal.

10 La divulgación también se refiere al uso de estos compuestos en la formación de imágenes y en el tratamiento del cáncer de próstata.

Antecedentes de la técnica.

15 El cáncer de próstata es uno de los cánceres más extendidos en EE. UU. y en Europa. En particular, el cáncer de próstata metastásico (mCRPC) se asocia con un mal pronóstico y una menor calidad de vida.

20 Recientemente, una nueva corriente de desarrollo para el tratamiento del cáncer de próstata es representada por la endo–radioterapia sobre la base de ligandos de PSMA, ya que se considera que el PSMA es un objetivo adecuado para imágenes y la terapia debido a su sobreexpresión en lesiones de cáncer primario y en enfermedad metastásica de tejidos blandos/óseo. Además, la expresión de PSMA parece ser incluso más alta en las variantes más agresivas de la enfermedad resistentes a la castración, lo que representa una población de pacientes con una gran necesidad médica insatisfecha (Marchal et al., *Histol*

Histopathol, 2004, julio; 19 (3): 715–8; Mease et al., *Curr Top Med Chem*, 2013, 13 (8): 951–62).

25 Entre muchos ligandos de moléculas pequeñas que se dirigen al PSMA, los agentes de bajo peso molecular a base de urea han sido los más investigados. Se demostró que estos agentes son adecuados para la evaluación clínica del cáncer de próstata, así como para la terapia PRRT (Kiess et al., *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 2015; 59: 241–68). Algunos de estos agentes tienen glutamato–urea–lisina (GUL) como andamio de

30 direccionamiento. Se creó una clase de moléculas siguiendo la estrategia de unir un enlazador entre el quelante y el resto GUL. Este enfoque permite que la urea alcance el sitio de unión mientras mantiene la parte quelada de metal sobre el exterior del sitio de unión. Esta estrategia tuvo éxito en tumores positivos para PSMA de xenoinjerto, debido a

su alta absorción y retención demostradas, así como a su rápido aclaramiento renal (Banerjee et al., J Med Chem, 2013; 56: 6108–21).

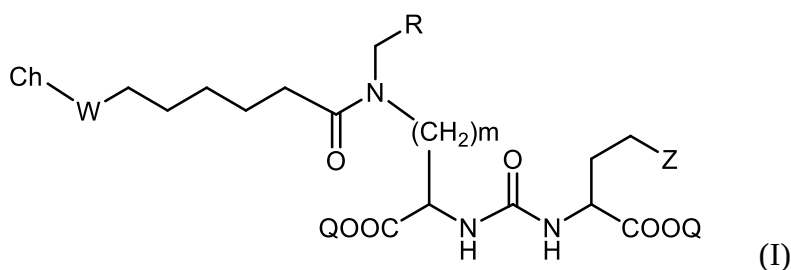
Sin embargo, algunos de estos compuestos aún muestran una alta absorción en diferentes órganos, como los riñones, lo que puede inducir toxicidad en pacientes

- 5 humanos. Por lo tanto, es deseable desarrollar nuevos ligandos de PSMA que tengan una baja absorción en diferentes órganos.

Síntesis de la divulgación.

En un primer aspecto, la presente divulgación se refiere a compuestos de fórmula

10 (I):



en donde:

Z es tetrazol o COOQ, preferentemente Z es COOQ;

Q es H o un grupo protector, preferentemente Q es H;

- 15 m es un número entero seleccionado del grupo de 1, 2, 3, 4, y 5, preferentemente m es 4;

R es seleccionado del grupo de arilo sustituido, piridina sustituida e isoquinolina no sustituida;

- 20 W es seleccionado del grupo de $-\text{NR}^2-(\text{C}=\text{O})$, $-\text{NR}^2-(\text{C}=\text{S})$, $-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^2$, y $-(\text{C}=\text{S})-\text{NR}^2$, preferentemente, W es $-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^2$;

R^2 es H o C1–C4 alquilo, preferentemente R^2 es H;

Ch es un agente quelante que opcionalmente comprende un metal o un radiometal; y sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 25 El enlazador entre el resto glutamato–urea–lisina (GUL) y el agente quelante Ch comprende una cadena de alquilo C_5 , que permite una menor absorción de la molécula radiomarcada en diferentes órganos, mientras que tiene una buena relación de tumor a riñón. Esta baja absorción indica una disminución de la toxicidad en pacientes humanos para estos tipos de moléculas. Además, la alta relación de tumor a riñón sugiere una buena visualización del tumor, cuando se utiliza en imágenes.

En un segundo aspecto, la divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) y por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable.

5 En un tercer aspecto, la divulgación se refiere a un compuesto de fórmula (I) para el uso como un medicamento.

En un cuarto aspecto, la divulgación se refiere a un compuesto de fórmula (I), para el uso en el tratamiento del cáncer, especialmente el cáncer de próstata.

En un quinto aspecto, la divulgación se refiere a un compuesto de fórmula (I), para el uso en la formación de imágenes.

10 En un sexto aspecto, la divulgación también se refiere a un método para tratar el cáncer de próstata, donde el método comprende poner en contacto las células cancerosas con una cantidad eficaz del compuesto de fórmula (I).

En un séptimo aspecto, la divulgación también se refiere a un método de formación de imágenes, donde el método comprende poner en contacto las células cancerosas con una
15 cantidad eficaz del compuesto de fórmula (I).

Breve descripción de los dibujos.

La Figura 1 muestra la biodistribución de ^{68}Ga -PSMA-R2 en ratones CD-1 sanos (Media de valores $\pm$ SD) de acuerdo con el Ejemplo 1.

20 La Figura 2 muestra la biodistribución de ^{68}Ga -PSMA-R2 en ratones CD-1 sanos (vejiga y riñón) (Media $\pm$ SD) de acuerdo con el Ejemplo 1.

La Figura 3 muestra la biodistribución de ^{68}Ga -PSMA-R2 (Media $\pm$ SD) en ratones atómicos que portan tumor positivo para PSMA (PIP) y negativo (Flu) de acuerdo con el Ejemplo 2.

25 La Figura 4 muestra la biodistribución de ^{68}Ga -PSMA-comp 2 (Media $\pm$ SD) en ratones atómicos que portan tumor positivo para PSMA (PIP) y negativo (Flu) de acuerdo con el Ejemplo 2.

La Figura 5 muestra el estudio de eficacia de ^{177}Lu -PSMA-R2 y ^{177}Lu -PSMA-617 en ratones atómicos que portan tumor PSMA positivo (PIP) de acuerdo con el Ejemplo 3.

30

Descripción detallada.

Definiciones.

Como se usa en este documento, el término "grupo protector" con referencia a compuestos de fórmula (I) se refiere a un sustituyente químico que puede eliminarse selectivamente mediante reactivos fácilmente disponibles que no atacan el grupo funcional regenerado u otros grupos funcionales en la molécula. Los grupos protectores adecuados se conocen en la técnica y continúan desarrollándose. Se pueden encontrar grupos protectores adecuados, por ejemplo, en Wutz et al. ("Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, Fourth Edition," Wiley– Interscience, 2007). Grupos protectores para la protección del grupo carboxilo, como describen Wutz et al. (páginas 533–643), se utilizan en determinadas formas de realización. En algunas formas de realización, el grupo protector se puede eliminar mediante tratamiento con ácido.

Los ejemplos representativos de grupos protectores incluyen, sin limitación, bencilo, p–metoxibencilo (PMB), butilo terciario (t–Bu), metoximetilo (MOM), metoxietoximetilo (MEM), metiltiommetilo (MTM), tetrahidropiranilo (THP), tetrahidrofuranilo (THF), benciloximetilo (BOM), trimetilsililo (TMS), trietilsililo (TES), t–butildimetilsililo (TBDMS) y trifenilmetilo (tritol, Tr). Los expertos en la técnica reconocerán situaciones apropiadas en las que se requieren grupos protectores y podrán seleccionar un grupo protector apropiado para usar en una circunstancia particular.

Como se usa en este documento, el término "arilo" se refiere a un grupo hidrocarbilo aromático poliinsaturado que tiene un solo anillo o múltiples anillos aromáticos fusionados entre sí, que contiene de 6 a 10 átomos de anillo, en donde por lo menos un anillo es aromático. El anillo aromático puede incluir opcionalmente uno a dos anillos adicionales (cicloalquilo, heterociclilo o heteroarilo como se define en el presente documento) fusionados a este. Los grupos arilo adecuados incluyen fenilo, naftilo y anillo fenilo fusionado con un heterociclilo, como benzopiranilo, benzodioxolilo, benzodioxanilo y similares.

Como se usa en este documento, los términos "arilo sustituido" y "piridina sustituida" se refieren a un arilo como se definió anteriormente o una piridina que se sustituye con uno o más sustituyentes seleccionados de: halógeno, $-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, $-SiR'R''R'''$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-C(O)NR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR''C(O)R'$, $-NR'-C(O)NR''R'''$, $-NR''C(O)OR'$, $-NR-C(NR'R''R''')=NR''''$, $-NR-C(NR'R'')=NR'''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NRSO_2R'$, $-CN$, $-NO_2$, $-R'$, $-N_3$, $-CH(Ph)_2$, fluoro(C_1-C_4)alcoxo, y fluoro(C_1-C_4)alquilo, en un número que va desde cero hasta el número total de valencias abiertas en el sistema de anillo aromático; y donde R' , R'' , R''' y R'''' pueden ser

seleccionados de manera independiente de hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo. Cuando un compuesto de la divulgación incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona de manera independiente, al igual que cada grupo R', R'', R''' y R''', cuando más de uno de estos grupos está presente.

5 Como se usa en este documento, el término "alquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, se refiere a un grupo funcional alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo adecuados incluyen metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, s-butilo y t-butilo, pentilo y sus isómeros (por ejemplo, n-pentilo, iso-pentilo) y hexilo y sus isómeros (por ejemplo, n-hexilo, iso-hexilo).

10 Como se usa en este documento, el término "heteroalquilo" se refiere a un grupo funcional alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono y de uno a tres heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N, Si y S, y donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden ser oxidados opcionalmente, y el heteroátomo de nitrógeno puede estar cuaternizado opcionalmente. El uno o más heteroátomos O, N y S pueden colocarse en
15 cualquier posición interior del grupo heteroalquilo, o en la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula.

 Como se usa en este documento, el término "cicloalquilo" se refiere a un grupo cíclico saturado o insaturado que tiene de 3 a 6 átomos de carbono. Los grupos cicloalquilo adecuados incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

20 Como se usa en este documento, el término "halógeno" se refiere a un grupo fluoro (-F), cloro (-Cl), bromo (-Br) o yodo (-I).

 Como se usa en el presente documento, el término "alcoxi" se refiere a un grupo -O-alquilo, en el que el grupo alquilo es un alquilo C₁-C₆ como se define en el presente documento. Los grupos alcoxi adecuados incluyen metoxi, etoxi, propoxi.

25 Como se usa en este documento, el término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo aromático poliinsaturado que tiene un solo anillo o múltiples anillos aromáticos fusionados entre sí o unidos covalentemente, que contiene de 5 a 10 átomos, en donde por lo menos un anillo es aromático y por lo menos un átomo del anillo es un heteroátomo seleccionado de N, O y S. Los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden ser oxidados
30 opcionalmente, y los heteroátomos de nitrógeno pueden ser cuaternizados opcionalmente. Dichos anillos pueden fusionarse con un anillo arilo, cicloalquilo o heterociclilo. Los ejemplos no limitantes de dicho heteroarilo incluyen: furanilo, tiofenilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, triazolilo, oxadiazolilo,

tiadiazolilo, tetrazolilo, oxatriazolilo, tiatriazolilo, piridinilo, pirimidilo, pirazinilo, piridazinilo, oxazinilo, dioxinilo, tiazinilo, triazinilo, indolilo, isoindolilo, benzofuranilo, isobenzofuranilo, benzotiofenilo, isobenzotiofenilo, indazolilo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, purinilo, benzotiadiazolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, cinolinilo y quinoxalinilo.

Como se usa en el presente documento, los términos "heterociclilo" o "heterocilcoalquilo" se refieren a un grupo cíclico saturado o insaturado que tiene de 5 a 10 átomos de anillo, en el que por lo menos un átomo del anillo es un heteroátomo seleccionado de N, O y S. Los heteroátomos de nitrógeno y azufre opcionalmente pueden ser oxidados, y los heteroátomos de nitrógeno opcionalmente pueden ser cuaternizados. Los ejemplos de heterociclo incluyen, sin limitación, tetrahidropiridilo, piperidinilo, morfolinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotienilo, piperazinilo, 1-azepanilo, imidazolinilo, 1,4-dioxanilo y similares.

En el presente documento se describen diversas formas de realización de la divulgación. Se reconocerá que las características especificadas en cada forma de realización pueden combinarse con otras características especificadas para proporcionar formas de realización adicionales.

La presente divulgación abarca los compuestos de fórmula (I), (II), (III) y (IV), sus estereoisómeros, tautómeros, enantiómeros, diastereómeros, racematos o mezclas de los mismos, y sus hidratos, solvatos o sales farmacéuticamente aceptables.

Los términos "sales farmacéuticamente aceptables" se refieren a sales que retienen la eficacia biológica y las propiedades de los compuestos de esta divulgación, y que típicamente no son biológicamente o de otro modo indeseables.

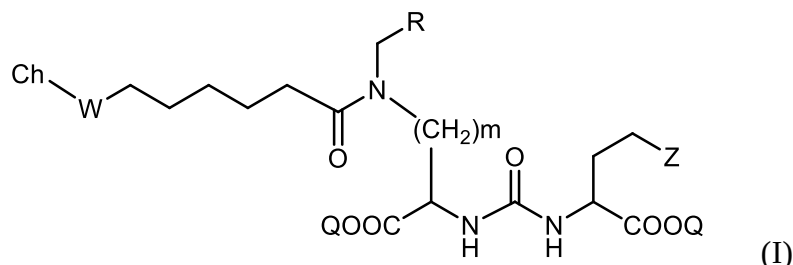
"Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción adversa cuando se administran a un mamífero, especialmente a un ser humano, según sea apropiado. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, un diluyente, material encapsulante o auxiliar de formulación sólido, semisólido o líquido no tóxico de cualquier tipo.

Como se usa en este documento, el término "sujeto" se refiere a un animal, preferentemente un mamífero, y más preferentemente, un ser humano.

Compuestos de fórmula (I).

En un primer aspecto, la presente divulgación se refiere a compuestos de fórmula

(I):



en donde:

Z es tetrazol o COOQ, preferentemente Z es COOQ;

Q es H o un grupo protector, preferentemente Q es H;

m es un número entero seleccionado del grupo de 1, 2, 3, 4, y 5, preferentemente m es 4;

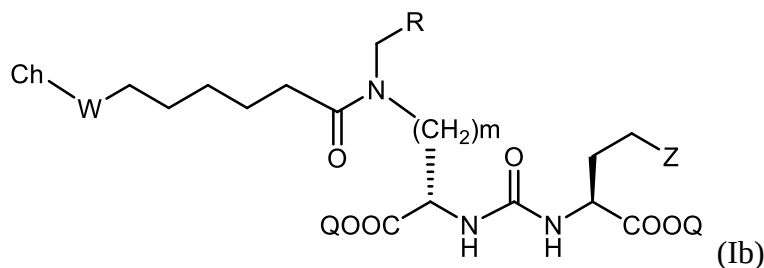
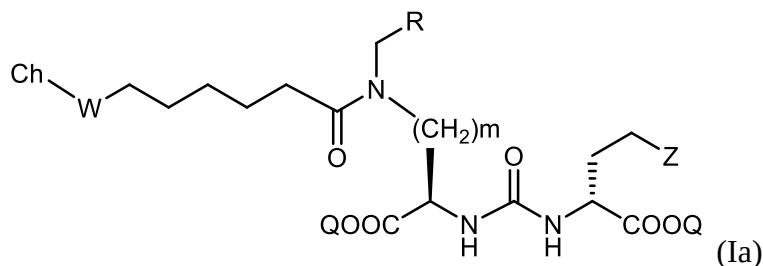
R es seleccionado del grupo de arilo sustituido, piridina sustituida e isoquinolina no sustituida;

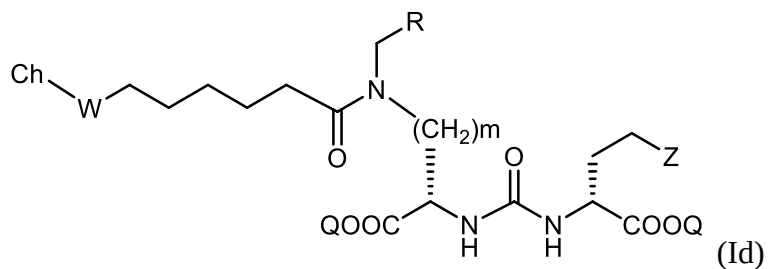
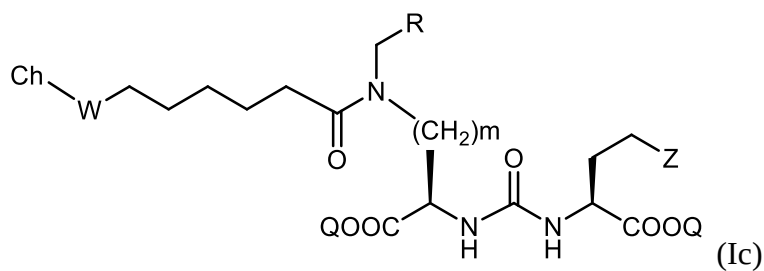
W es seleccionado del grupo de $-\text{NR}^2-(\text{C}=\text{O})$, $-\text{NR}^2-(\text{C}=\text{S})$, $-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^2$, y $-(\text{C}=\text{S})-\text{NR}^2$, preferentemente, W es $-(\text{C}=\text{O})-\text{NR}^2$;

R^2 es H o C1-C4 alquilo, preferentemente R^2 es H;

Ch es un agente quelante que opcionalmente comprende un metal o un radiometal; y sus sales farmacéuticamente aceptables.

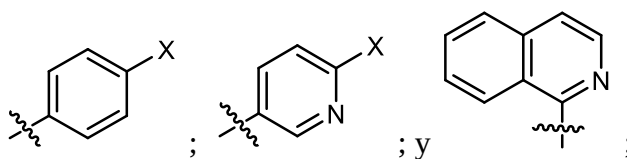
Compuestos de fórmula (I) incluyen los estereoisómeros de las fórmulas (Ia), (Ib), (Ic) y (Id):





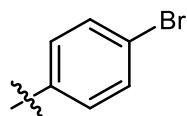
De acuerdo con una forma de realización, R es seleccionado del grupo de arilo sustituido con uno o más halógeno, piridina sustituida con uno o más halógeno, e isoquinilina no sustituida.

De acuerdo con una forma de realización específica, R es seleccionado del grupo de:



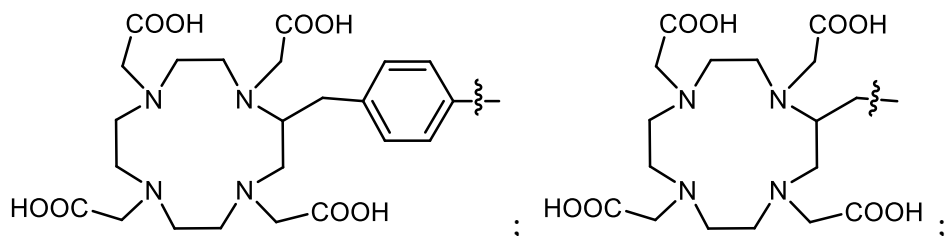
en donde X es de manera independiente Br o I.

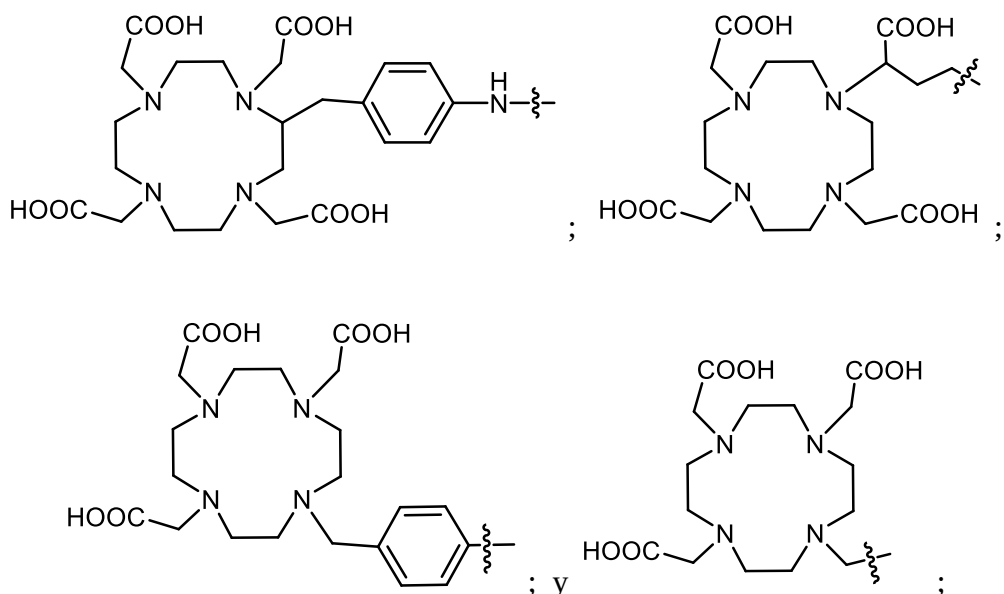
Convenientemente, R es



10

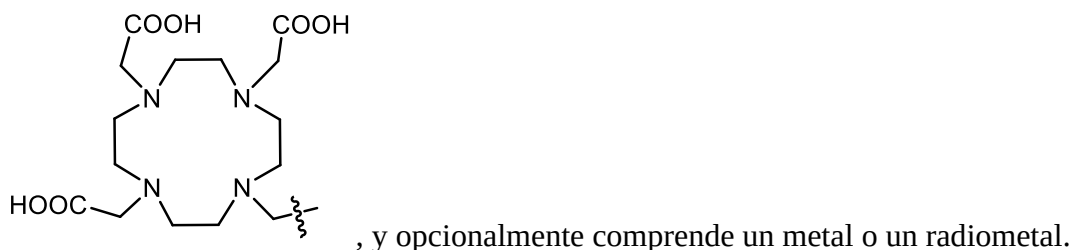
Ch puede ser seleccionado del grupo de:





y opcionalmente comprende un metal o un radiometal.

5 De acuerdo con una forma de realización específica, Ch es



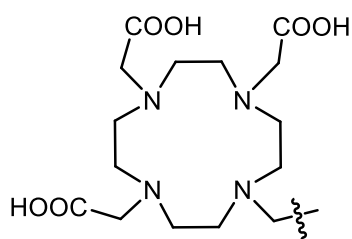
El metal o radiometal es preferentemente seleccionado de metales y radiometales que son adecuados para el uso en el método de formación de imágenes o en terapia.

10 De acuerdo con una forma de realización, Ch comprende un metal seleccionado de Y, Lu, Tc, Zr, In, Sm, Re, Cu, Pb, Ac, Bi, Al, Ga, Re, Ho y Sc. El metal puede ser un radiometal seleccionado de ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{177}Lu , ^{153}Sm , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{67}Cu , ^{212}Pb , ^{225}Ac , ^{213}Bi , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{67}Ga , ^{203}Pb , ^{47}Sc , y ^{166}Ho .

Convenientemente, Ch comprende un radiometal ^{68}Ga o ^{177}Lu o ^{225}Ac .

15 El compuesto de fórmula (I) puede distribuirse en el cuerpo de un animal o humano portador de tumor de tal manera que, 1 h después de la inyección intravenosa del compuesto, la relación de tumor a riñón es por lo menos 5 (media de valores de por lo menos $N = 4$).

De acuerdo con una forma de realización, W es $-(C=O)-NR^2-$, y Ch es

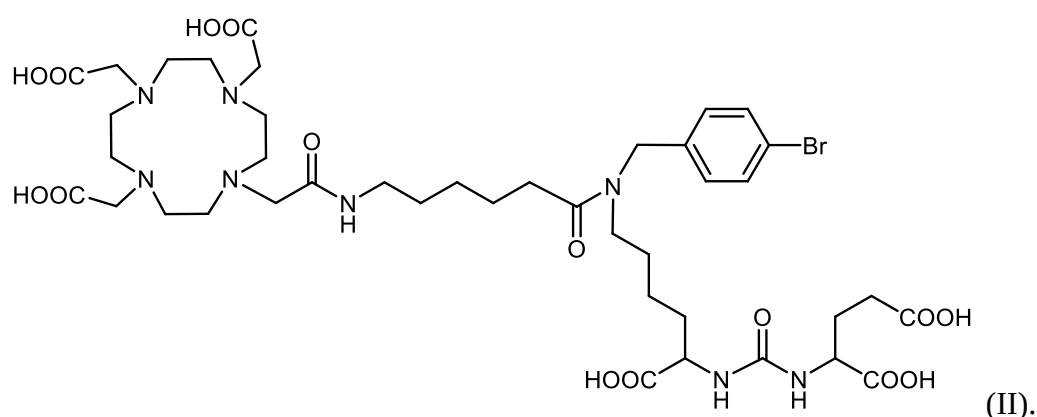


, y opcionalmente comprende un metal o un radiometal.

De acuerdo con una forma de realización, m es 4, Z es COOQ, y Q es H.

De acuerdo con una forma de realización específica, el compuesto de fórmula (I) es

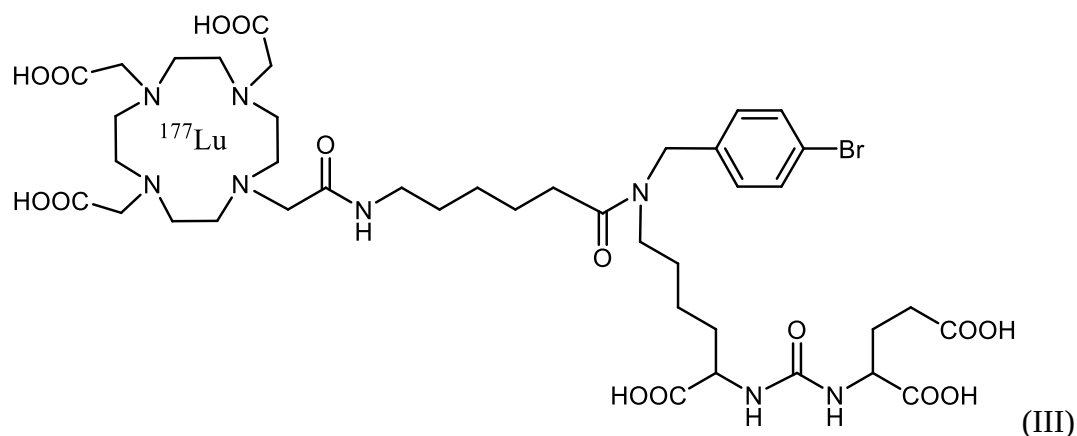
5 el compuesto de fórmula (II):



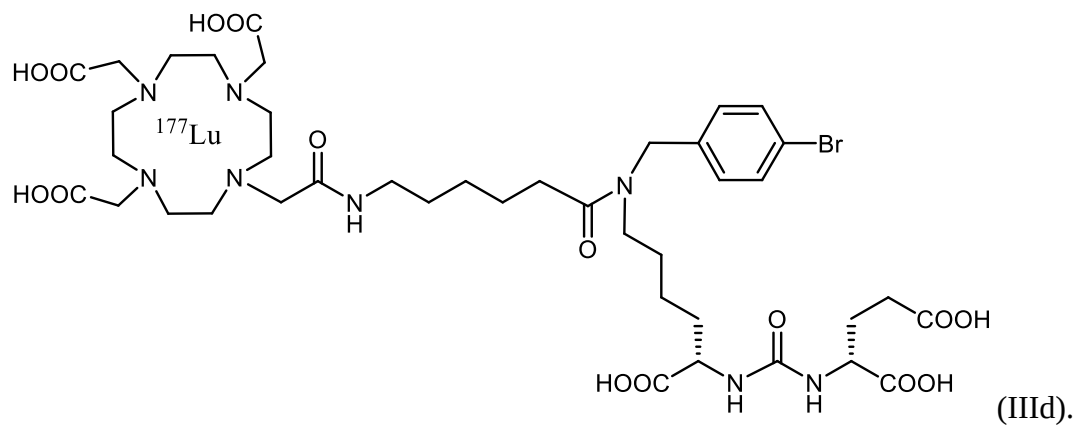
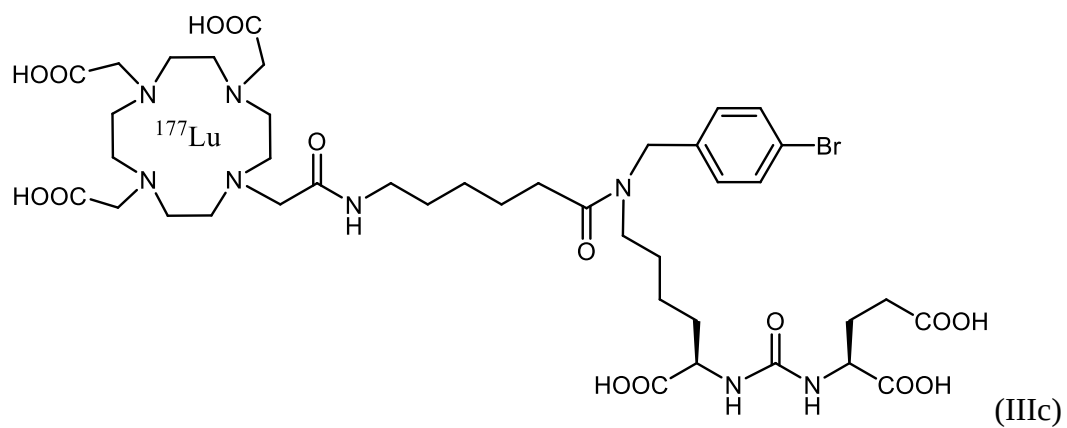
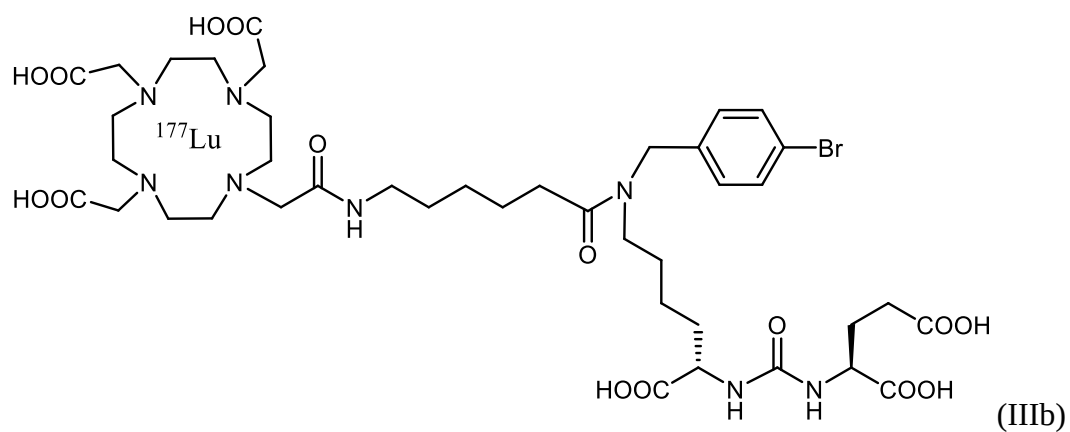
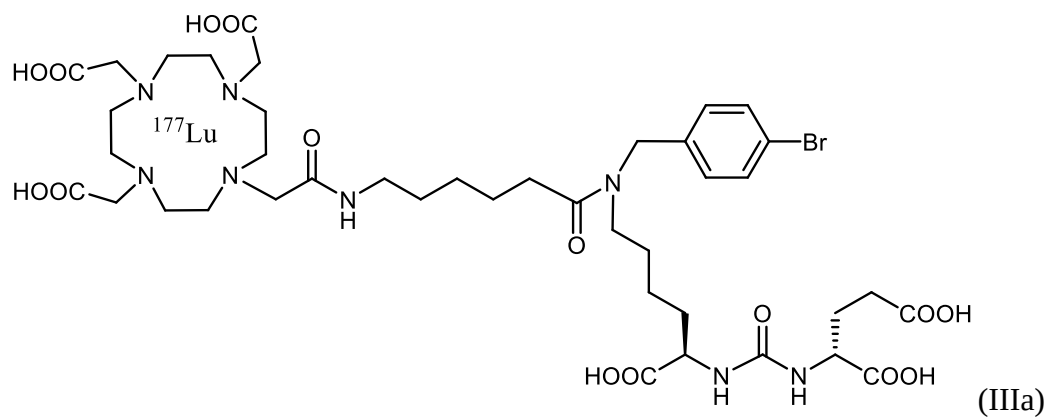
El compuesto de fórmula (II) puede ser denominado PSMA-R2. El compuesto de fórmula (II) puede comprender un metal o un radiometal, preferentemente ^{68}Ga o ^{177}Lu .

De acuerdo con una forma de realización, el compuesto de fórmula (I) es el

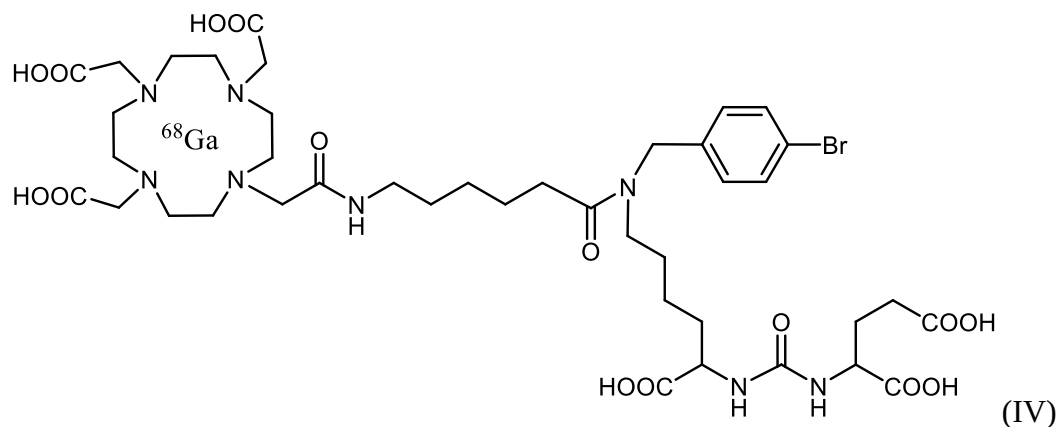
10 compuesto de fórmula (III):



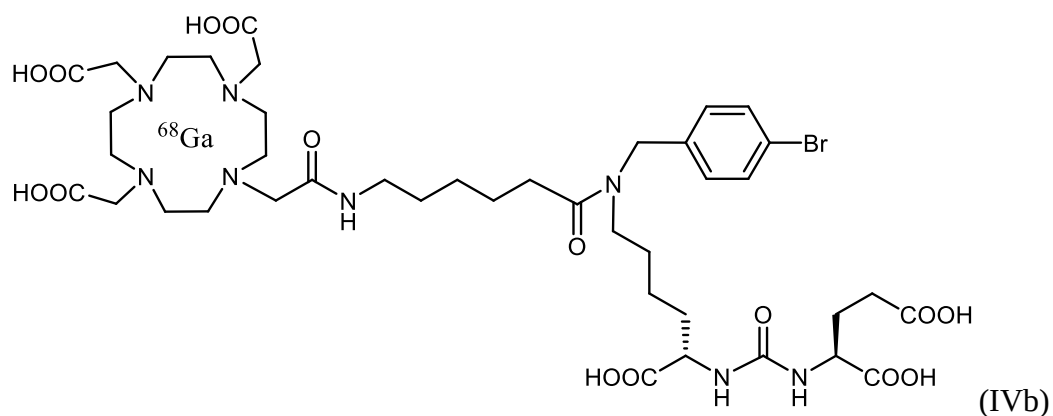
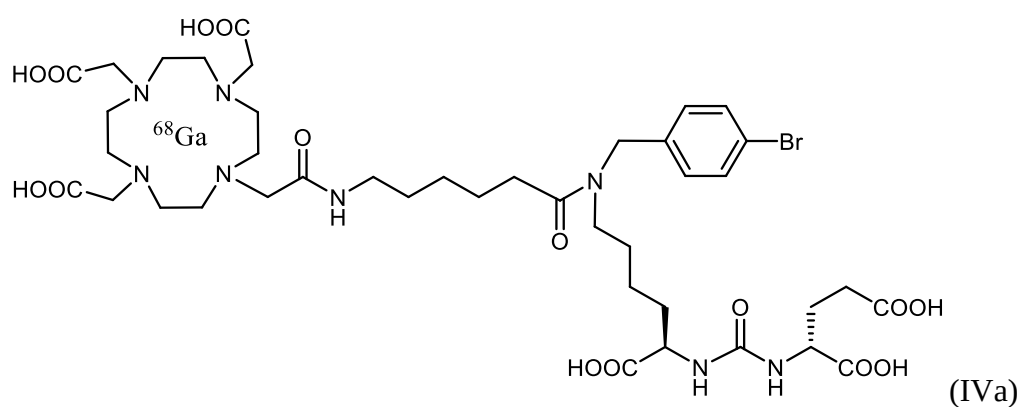
El compuesto de fórmula (III) puede ser denominado ^{177}Lu -PSMA-R2. Los compuestos de fórmula (III) incluyen los estereoisómeros de las fórmulas (IIIa), (IIIb), (IIIc) y (IIId):

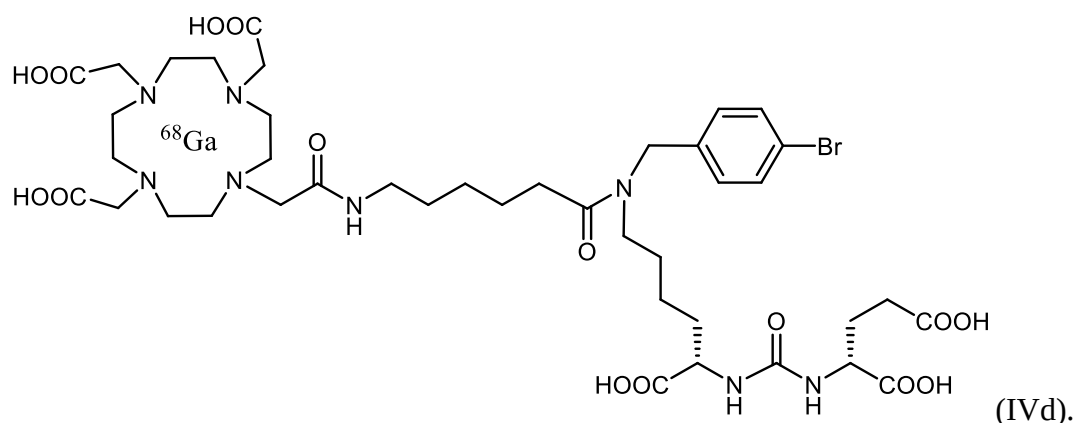
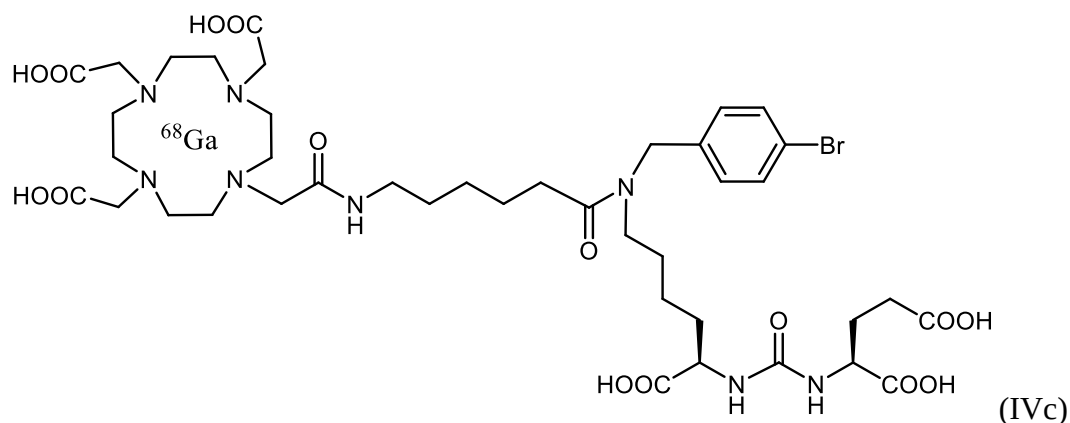


De acuerdo con otra forma de realización, el compuesto de fórmula (I) es el compuesto de fórmula (IV):



- 5 El compuesto de fórmula (IV) puede ser denominado ^{68}Ga -PSMA-R2. Los compuestos de fórmula (IV) incluyen los estereoisómeros de las fórmulas (IVa), (IVb), (IVc) y (IVd):





5 Composición farmacéutica.

La divulgación también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) a (IV) y por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable.

La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosificación y el régimen dependen naturalmente de la afección por tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del paciente, etc.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación se pueden formular para una administración intravenosa, intramuscular o subcutánea y similares.

Las composiciones farmacéuticas pueden adoptar la forma de una solución acuosa, por ejemplo, una formulación inyectable que comprende por lo menos un compuesto de acuerdo con esta divulgación.

Preferentemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estas pueden ser en particular soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de tales sales), o

composiciones secas, especialmente liofilizadas, que luego de la adición, según el caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el solvente apropiado, con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional, a partir de una solución previamente esterilizada filtrada de los mismos. Luego de la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una diversidad de formas de dosificación, tal como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución puede tamponarse de manera adecuada, y el diluyente líquido primero puede volverse isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este sentido, los expertos en la técnica conocerán los medios acuosos estériles que pueden emplearse a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación podría disolverse en 1 ml de solución isotónica de NaCl y agregarse a 1000 ml de líquido de hipodermocclisis, o inyectarse en el sitio de infusión propuesto (ver, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15ª edición, páginas 1035–1038 y 1570–1580). Necesariamente se producirá alguna variación en la dosificación de acuerdo con el estado del sujeto que se esté tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

En una forma de realización particular, la composición farmacéutica comprende uno o más excipientes que se seleccionan de estabilizadores contra la degradación radiolítica, agentes secuestrantes y mezclas de los mismos.

Como se usa en este documento, "estabilizador contra la degradación radiolítica" se refiere a un agente estabilizador que protege las moléculas orgánicas contra la degradación radiolítica, p. ej., cuando un rayo gamma emitido desde el radionúclido está escindiendo un enlace entre los átomos de una molécula orgánica y los radicales, esos radicales son eliminados por el estabilizador, que evita que los radicales experimenten cualquier otra reacción química que pueda conducir a reacciones no deseadas, potencialmente ineficaces, o incluso, moléculas tóxicas. Por lo tanto, estos estabilizadores también se denominan "captadores de radicales libres" o, de forma abreviada, "captadores de radicales". Otros términos alternativos para esos estabilizadores son "mejoradores de la estabilidad de la radiación", "estabilizadores radiolíticos" o simplemente "desactivadores".

Como se usa en el presente documento, "agente secuestrante" se refiere a un agente quelante adecuado para complejar iones metálicos radionúclidos libres en la formulación (que no forman complejos con el péptido radiomarcado).

Las dosis utilizadas para la administración se pueden adaptar en función de diversos parámetros, y en particular, en función del modo de administración utilizado, de la patología pertinente, o alternativamente, de la duración deseada del tratamiento. Se apreciará que las dosificaciones apropiadas de los compuestos y las composiciones que comprenden los compuestos pueden variar de un paciente a otro. La determinación de la dosificación óptima generalmente implicará el equilibrio del nivel de beneficio terapéutico frente a cualquier riesgo o efectos secundarios perjudiciales de los tratamientos descritos en este documento.

Compuestos de fórmula (I) a (IV) para uso como un medicamento.

La divulgación también se refiere a un compuesto de fórmula (I) a (IV) para el uso como un medicamento. Los compuestos de fórmula (I) a (IV) exhiben valiosas propiedades farmacéuticas, como se indica en las pruebas proporcionadas en los ejemplos y, por lo tanto, están indicados para terapia.

La divulgación también se refiere a un compuesto de fórmula (I) a (IV) para el uso en el tratamiento del cáncer, en particular, mediante terapia alfa dirigida y mediante radiación beta.

El compuesto de fórmula (III) es particularmente adecuado para el uso como un medicamento, preferentemente, para el uso en el tratamiento del cáncer.

Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" tiene su significado general en la técnica, e incluye un estado o afección anormal caracterizado por un

crecimiento celular que prolifera rápidamente. El término pretende incluir todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos, o células, tejidos u órganos transformados malignamente, independientemente del tipo histopatológico o estadio de invasión. El término cáncer incluye neoplasias malignas de los diversos sistemas de órganos, tales como las que afectan piel, pulmón, mama, tiroides, linfoides, tracto gastrointestinal y genitourinario, así como adenocarcinomas que incluyen neoplasias malignas, tales como la mayoría de los cánceres de colon, carcinoma de células renales, cáncer de próstata y/o tumores testiculares, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer de intestino delgado y cáncer de esófago.

Los ejemplos de cáncer incluyen, sin limitación, neoplasias malignas hematológicas tales como neoplasia linfoides de células B, neoplasia linfoides de células T, linfoma no hodgkiniano (NHL, conforme a sus siglas en inglés), B–NHL, T–NHL, leucemia linfocítica crónica (CLL, conforme a sus siglas en inglés), linfoma linfocítico pequeño (SLL, conforme a sus siglas en inglés), linfoma de células del manto (MCL, conforme a sus siglas en inglés), neoplasia linfoides de células NK y neoplasia de linaje de células mieloides. Los ejemplos de cánceres no hematológicos incluyen, sin limitación, cáncer de piel, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, cáncer de huesos, cáncer de cuello uterino, cáncer, cáncer de hígado, cáncer oral, cáncer de esófago, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, cáncer de estómago y cáncer testicular

En una forma de realización específica, el cáncer es un cáncer que tiene células o tumores que expresan PSMA

En una forma de realización específica, la divulgación también se refiere a un compuesto de fórmula (I) a (IV) para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata

En una forma de realización específica, el cáncer de próstata es un cáncer de próstata metastásico.

La divulgación también se refiere a un compuesto de fórmula (I) a (IV) para su uso en el tratamiento de células o tumores que expresan PSMA

El tumor o la célula que expresa PSMA puede seleccionarse del grupo que consiste en: un tumor o célula de próstata, un tumor o célula de próstata metastásico, un tumor o célula de pulmón, un tumor o célula renal, un glioblastoma, un tumor o célula de páncreas, un tumor o célula de vejiga, sarcoma, melanoma, célula o tumor de mama, célula o tumor de colon, célula germinal, feocromocitoma, célula o tumor de esófago, célula o tumor de

estómago y combinaciones de los mismos. En algunas otras formas de realización, los tumores o las células que expresan PSMA son un tumor o una célula de próstata.

Por lo tanto, la divulgación también se refiere a un método para tratar el cáncer, donde el método comprende poner en contacto las células cancerosas con una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula (I) a (IV).

Como se usa en el presente documento, el término "poner en contacto" significa cualquier acción que logre que por lo menos un compuesto que comprende el agente terapéutico del objeto del asunto descrito en este momento contacte físicamente por lo menos una célula cancerosa. El contacto puede incluir exponer las células o los tumores al compuesto, en una cantidad suficiente para lograr el contacto de por lo menos un compuesto con por lo menos una célula o un tumor. El método se puede poner en práctica *in vitro* o *ex vivo* introduciendo, y preferentemente mezclando el compuesto y las células o los tumores en un entorno controlado, tal como una placa de cultivo o un tubo. El método se puede llevar a la práctica *in vivo*, en cuyo caso, poner en contacto significa exponer por lo menos una célula o un tumor en un sujeto a por lo menos un compuesto del objeto del asunto actualmente descrito, tal como administrar el compuesto a un sujeto por cualquier vía adecuada.

En una forma de realización específica, el cáncer por tratar es un cáncer que tiene células o tumores que expresan PSMA. Por ejemplo, el cáncer por tratar puede ser un cáncer de próstata, que incluye el cáncer de próstata metastásico.

La divulgación también se refiere a un método para tratar el cáncer, típicamente cáncer de próstata, donde el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita, preferentemente un ser humano, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula (I) a (IV).

Como se usa en este documento, el término "tratar" incluye revertir, aliviar, inhibir la progresión, prevenir o reducir la probabilidad de la enfermedad, el trastorno o la afección a los que se aplica dicho término, o uno o más síntomas o manifestaciones de dicha enfermedad, trastorno o afección. Prevenir se refiere a hacer que no se produzca una enfermedad, un trastorno, una afección o un síntoma o manifestación de los mismos, o el empeoramiento de la gravedad de los mismos. Por consiguiente, los compuestos descriptos en el presente documento se pueden administrar de forma profiláctica para prevenir o reducir la incidencia o recurrencia de la enfermedad, el trastorno o la afección.

Como se usa en este documento, los términos "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto se refieren a una cantidad del compuesto que provocará la respuesta biológica o médica de un sujeto, por ejemplo, mejorará los síntomas, aliviará las afecciones, ralentizará o retrasará la progresión de la enfermedad, o prevendrá una enfermedad.

5 La divulgación también se refiere a un método para tratar tumores o células que expresan PSMA, donde el método comprende poner en contacto tumores o células que expresan PSMA con una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula (I) a (IV).

10 La divulgación también se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) a (IV) para la fabricación de un medicamento.

La divulgación también se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) a (IV) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, como el cáncer de próstata.

15 La divulgación también se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) a (IV) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de tumores o células que expresan PSMA.

Compuestos de fórmula (I) a (IV) para el uso en la formación de imágenes y sus métodos.

20 La divulgación también se refiere a un compuesto de fórmula (I) a (IV) para el uso en la formación de imágenes, preferentemente, la formación de imágenes *in vivo*.

La divulgación también se refiere a un compuesto de fórmula (I) a (IV) para el uso en la formación de imágenes de tumores o células que expresan PSMA.

25 El compuesto de fórmula (IV) es particularmente adecuado para el uso en la formación de imágenes, preferentemente para su uso en la formación de imágenes de tumores o células que expresan PSMA.

En una forma de realización específica, el método de formación de imágenes en el que se usa el compuesto de fórmula (I) a (IV) es PET (tomografía por emisión de positrones, conforme a sus siglas en inglés) o SPECT (tomografía computarizada por emisión de fotón único, conforme a sus siglas en inglés).

30 Por lo tanto, la divulgación también se refiere a un método de formación de imágenes, donde el método comprende poner en contacto células cancerosas con una cantidad eficaz del compuesto de fórmula (I) a (IV).

La divulgación también se refiere a un método para obtener imágenes de tumores o células que expresan PSMA, donde el método comprende poner en contacto tumores o células que expresan PSMA con una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula (I) a (IV). El método puede comprender además una etapa de detección de la señal derivada de la desintegración del radiometal presente en dicho compuesto.

La divulgación también se refiere a un método para obtener imágenes de tumores o células que expresan PSMA en un sujeto, donde el método comprende administrar a dicho sujeto, preferentemente un ser humano, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula (I) a (IV), y detectar la señal derivada de la desintegración del radiometal presente en dicho compuesto.

En una forma de realización específica, la presente divulgación proporciona un método para detectar la presencia o ausencia de tumores que expresan PSMA en un sujeto, que comprende:

- (i) administrar un compuesto de fórmula (I) a (IV), p. ej., como una inyección intravenosa en dicho sujeto;
- (ii) adquirir una imagen, típicamente, mediante imágenes PET o SPECT; y,
- (iii) detectar la presencia o ausencia de tumores que expresan PSMA en dicho sujeto.

La divulgación también se refiere a un compuesto de fórmula (I) a (IV) para el uso en diagnóstico, típicamente, para el uso en el diagnóstico de trastornos cancerosos, tales como cánceres que expresan PSMA.

La divulgación también se refiere a un método para diagnosticar y/o detectar células cancerosas o tumores o células que expresan PSMA, por ejemplo, tumores o células de próstata en un sujeto, donde el método comprende administrar a dicho sujeto, preferentemente un ser humano, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de fórmula (I) a (IV), y detectar la señal derivada de la desintegración del radiometal presente en dicho compuesto.

Síntesis de los compuestos de fórmula (I) a (IV).

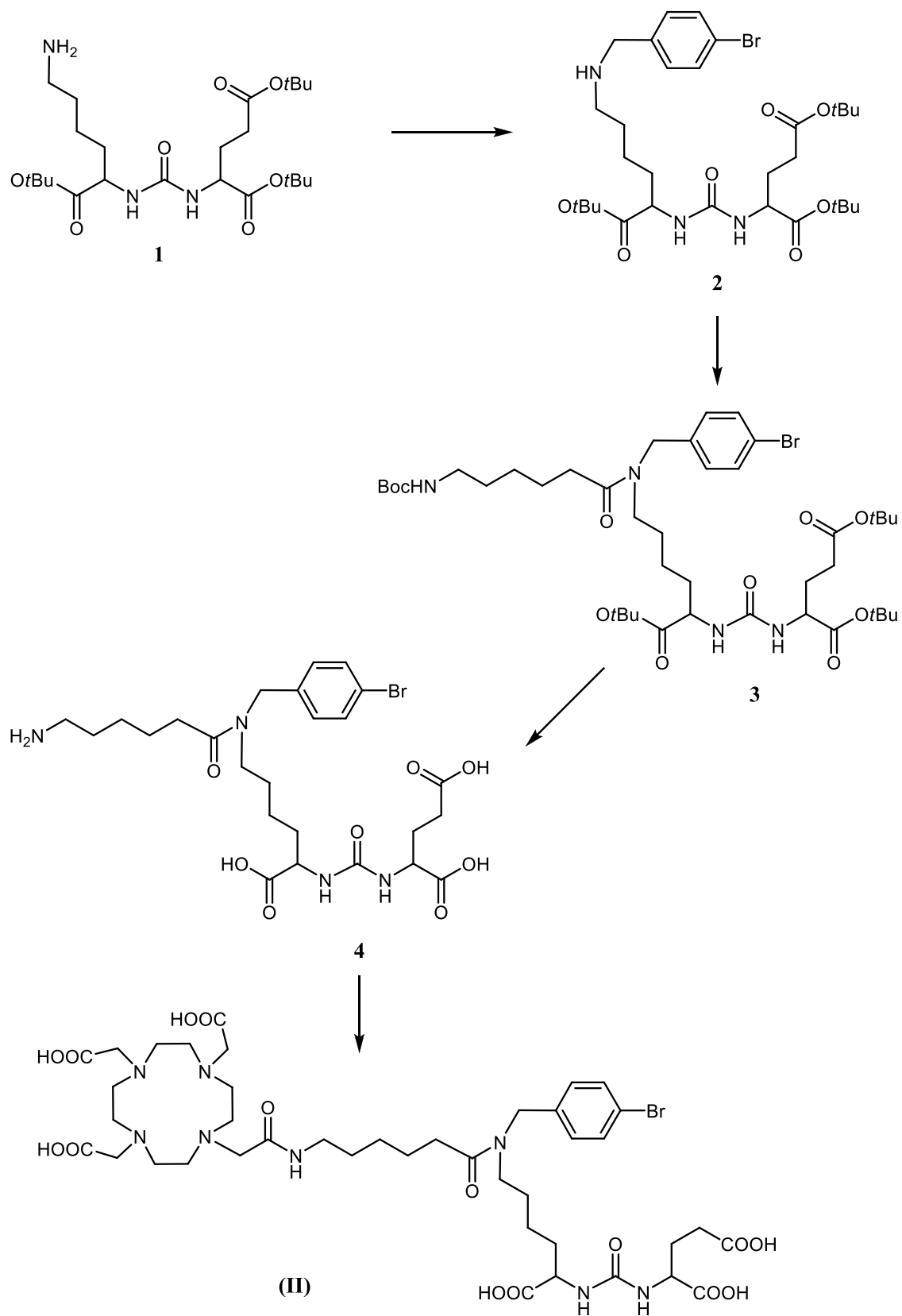
Los compuestos de fórmula (I) y (II) pueden sintetizarse usando los métodos que se divulgan en el documento WO2017/165473.

En particular, el compuesto de fórmula (II) se puede sintetizar como se describe en el esquema 1. El grupo p-bromobencilo modificado de Glu-Lys urea **2** se puede preparar mediante alquilación reductora de Glu-Lys urea **1** con p-bromobenzaldehído en presencia

de cianoborohidruro de sodio en metanol. Este procedimiento se ha descrito en la literatura (Tykvart et al. (2015) Journal of medicinal chemistry 58, 4357–63). Luego, un enlazador alifático, el ácido Boc–6–aminohexanoico, se puede acoplar a la misma amina ϵ –Lys de **2**, por ejemplo, usando una base (tal como N,N–diisopropiletilamina) y un agente de acoplamiento (como N,N,N',N'–Tetrametil–O–(N–succinimidil)uronio tetrafluoroborato, o 1–[bis(dimetilamino)metilen]–1H–1,2,3–triazolo[4,5–b]piridinio 3–oxid hexafluorofosfato), para producir el compuesto **3**. El compuesto **3** puede desprotegerse luego para producir el compuesto **4**, por ejemplo, usando un ácido como el ácido trifluoroacético. Finalmente, se puede realizar la conjugación con el éster DOTA–NHS comercialmente disponible, para producir el compuesto (II).

Los compuestos de fórmula (I) y (II) pueden marcarse radiactivamente usando métodos que se utilizan comúnmente en el campo del marcaje radiactivo. En particular, el compuesto de fórmula (II) también puede marcarse radiactivamente con ^{177}Lu , para formar el compuesto de fórmula (III), usando el método descrito en el documento WO2017/165473. El compuesto de fórmula (II) también puede marcarse radiactivamente con ^{68}Ga , para formar el compuesto de fórmula (IV), usando el método descrito en el documento WO024013.

Esquema 1: Síntesis del compuesto de fórmula (II).

**Ejemplos.**

Ejemplo 1: Distribución *in vivo* en animales sanos (estudio realizado con ^{68}Ga –PSMA–R2).

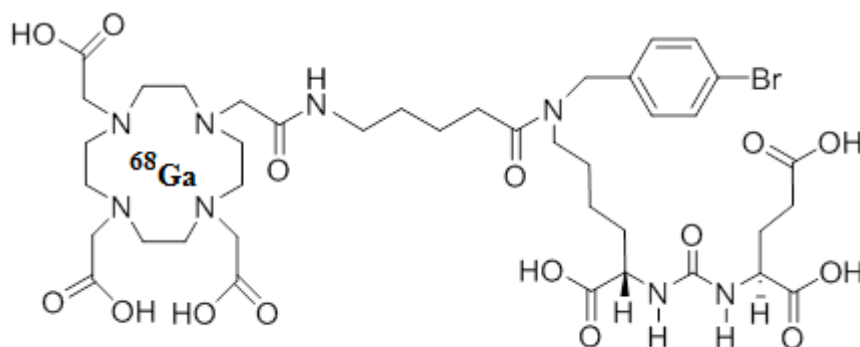
Se realizaron estudios de distribución *in vivo* en ratones CD–1 sanos utilizando PSMA–R2 marcado con Ga, que se administró por vía intravenosa en una dosis de 120–150 μCi (4,44–5,55 MBq). En momentos específicos después de la inyección intravenosa, se sacrificaron los animales (3 o 4 por grupo), se recogieron los órganos, se pesaron y se evaluaron en un contador gamma. Los valores de % ID/g calculados se informan en la Figura 1 y la Figura 2.

La absorción de ^{68}Ga –PSMA–R2 en los riñones y la vejiga indicó que el radiotrazador se excreta a través del sistema renal (Figura 2). La absorción hepática registrada fue muy baja (0,74 % a los 30 minutos, disminuyendo a 0,21 % a las 4 horas), lo que indica una excreción mínima a través del sistema hepatobiliar (Figura 1). Aunque se registró una absorción de radiotrazador ligeramente alta en la sangre y otros órganos como las glándulas suprarrenales, los pulmones y la tiroides en el punto de tiempo más temprano (30 min), el valor de % ID disminuyó rápidamente en los puntos de tiempo posteriores (Figura 1). Se detectó una baja absorción de radiotrazador en los órganos restantes (intestino, páncreas, músculo, hueso) en todos los puntos temporales (incluido el más temprano, 30 min).

Ejemplo 2: Distribución *in vivo* en modelos tumorales (estudio realizado con ^{68}Ga –PSMA–R2).

Se inyectaron aproximadamente 4,5 MBq de ^{68}Ga –PSMA–R2 a ratones machos atómicos que portaban los xenoinjertos de tumor PC–3 PSMA positivos y PSMA negativos, y posteriormente se evaluaron para estudios de biodistribución y de formación de imágenes. En 4 puntos de tiempo (30 min, 1 h, 2 h y 4 h) después de la inyección (p. i.), se determinó la absorción de órgano y tumor usando un contador gamma. Para evaluar la especificidad del receptor, se coinyectaron grupos adicionales de animales con un exceso de PSMA–R2 sin marcar (40 nmol). Los resultados se muestran en la Fig. 3.

El mismo estudio se realizó con ^{68}Ga –PSMA–comp 2, un compuesto comparativo de la siguiente fórmula:



Los resultados se muestran en la Fig. 4.

La absorción de tumor, absorción de riñón, absorción de glándulas salivales y la relación de tumor a riñón para ^{68}Ga -PSMA-R2 y ^{68}Ga -PSMA-comp 2 se resumen en la

5 Tabla 1.

Tabla 1: Comparación de ^{68}Ga -PSMA-R2 y ^{68}Ga -PSMA-comp 2.

	^{68}Ga -PSMA-R2	^{68}Ga -PSMA-comp2
Absorción de tumor	29 % (1 h)	36 % (1 h)
Absorción de riñón	6 % (1 h)	13 % (1 h)
Relación tumor a riñón	5 (1 h)	3 (1 h)
Glándulas salivales	0,81 % (0,5 h)	0,95 % (0,5 h)

Estos resultados muestran que, después de 1 hora, la absorción renal y la absorción de las glándulas salivales son menores para ^{68}Ga -PSMA-R2 en comparación con el compuesto comparativo ^{68}Ga -PSMA-comp2. Además, la relación de tumor a riñón es mayor en el caso de ^{68}Ga -PSMA-R2.

Esto indica una posible menor toxicidad de ^{68}Ga -PSMA-R2 en comparación con ^{68}Ga -PSMA-comp2. Además, la alta relación de tumor a riñón después de 1 hora sugiere una mejor visualización del tumor en el caso de ^{68}Ga -PSMA-R2, ya que el punto de tiempo óptimo para la obtención de imágenes es de 45 minutos a 1 hora.

Ejemplo 3: Eficacia *in vivo* en ratones en modelo positivo de PC3-PIP PSMA.

Se realizó un estudio de eficacia en un modelo de cáncer de próstata utilizando PSMA-R2 marcado con Lu.

A los ratones que portaban tumor PC3-PIP (PSMA positivo) se los inyectó una vez con 111 MBq de ^{177}Lu -PSMA-R2, ^{177}Lu -PSMA-617, incluido como compuesto de referencia, o con solución salina (control).

El volumen del tumor se expresa como un valor absoluto (mm^3), o en relación con el volumen medido en el momento de la primera inyección.

Los resultados de los volúmenes tumorales absolutos muestran que el volumen tumoral se reduce significativamente en los grupos de ^{177}Lu -PSMA-R2 y ^{177}Lu -PSMA-617 en comparación con el grupo de control ($p < 0,001$) (véase la Fig. 5A).

De manera similar, cuando los datos se expresan como volúmenes relativos, se encuentra que los volúmenes tumorales de ambos grupos ^{177}Lu -PSMA-R2 y ^{177}Lu -PSMA-617 se reducen significativamente en comparación con el grupo de control ($p < 0,001$) (véase la Figura 5B).

No se observaron diferencias entre los volúmenes tumorales de los dos grupos tratados cuando se expresaron como volumen absoluto o relativo. En la Figura 5C-F, se muestran el volumen tumoral absoluto y el volumen tumoral relativo de los dos subgrupos tratados en un intervalo de dos días.

Estos resultados muestran que ^{177}Lu -PSMA-R2 es eficaz para reducir el tamaño de los tumores positivos a PSMA en ratones. ^{177}Lu -PSMA-R2 exhibe así valiosas propiedades farmacéuticas y, por lo tanto, puede estar indicado para terapia.

Ejemplo 4: Farmacología de seguridad.

Pruebas de comportamiento de Irwin y efecto sobre la temperatura corporal luego de una única administración intravenosa en ratas.

El objetivo de este estudio fue evaluar los posibles efectos de ^{175}Lu -PSMA-R2, en dosis de 0,2, 0,6 y 2,0 mg/kg, sobre los parámetros generales de comportamiento en la rata luego de la administración intravenosa, de acuerdo con el diseño del estudio en la Tabla 2.

Tabla 2: Diseño experimental de la prueba de comportamiento de Irwin.

Grupo Número	Tratamiento (mg/kg) +	Nivel de dosis	Volumen de dosis (mL/kg)	Nro. de ratas y género
1	0	Vehículo	5	5M
2	0,2	Bajo	5	5M
3	0,6	Medio	5	5M

4	2,0	Alto	5	5M
	+: en términos de artículo de prueba como fue suministrado			

Se evaluaron los siguientes parámetros: mortalidad, peso corporal, signos clínicos y prueba de Irwin.

La prueba de Irwin se realizó en los siguientes intervalos después de la dosificación:

5 5, 15, 30 minutos y 1, 2 y 24 horas.

Una única administración intravenosa de ^{175}Lu -PSMA-R2, en dosis de 0,2, 0,6 y 2,0 mg/kg no indujo ningún efecto sobre los parámetros conductuales, neurológicos o autonómicos en el estudio de Irwin en ratas hasta 24 h después de la dosis. No se produjeron muertes durante el estudio, y no se observaron signos clínicos durante el período de observación de 6 días.

Los resultados del estudio se resumen en la Tabla 10.

Evaluación del efecto sobre la respiración en la rata consciente no restringida después de la administración intravenosa única.

15 El objetivo de este estudio fue evaluar los posibles efectos de 0,2, 0,6 y 2,0 mg/kg de ^{175}Lu PSMA-R2 sobre la función respiratoria de ratas conscientes mediante un método de pletismografía de cuerpo entero después de la administración intravenosa de acuerdo con el diseño del estudio detallado en la Tabla 3.

20 Tabla 3: Diseño experimental del estudio sobre la evaluación de los efectos sobre la función respiratoria.

Grupo Número	Tratamiento				
	Tratamiento (mg/kg)	Nivel de dosis	Volumen de dosis (mL/kg)	Teofilina (mg/kg)	Nro. de ratas y género
1	0	Vehículo	5	0	8M
2	0,2	Bajo	5	0	8M
3	0,6	Medio	5	0	8M
4	2,0	Alto	5	0	8M

5	0	Referencia	5	25	8M
---	---	------------	---	----	----

El tiempo inspiratorio, el tiempo espiratorio, el flujo inspiratorio máximo, el flujo espiratorio máximo, el volumen corriente, el tiempo de relajación, el volumen por minuto, la frecuencia respiratoria y la pausa mejorada se registraron continuamente desde aproximadamente 1 hora antes de la dosificación hasta 4 horas después de la dosificación. El número de ratas y los parámetros de género se informaron antes de la dosis y a los 5, 15 y 30 minutos y 1, 1,5, 2, 3 y 4 horas después de la dosis. Los signos clínicos se registraron el día de la dosificación.

Los resultados del estudio se resumen en la Tabla 10.

Efectos sobre la función cardiovascular del cerdo miniatura consciente después de la administración intravenosa.

El propósito de este estudio fue investigar los efectos potenciales de ^{175}Lu -PSMA-R2 sobre las funciones cardiovasculares del cerdo miniatura macho telemido consciente después de la administración intravenosa en dosis de 0,058, 0,175 y 0,583 mg/kg. El diseño experimental se muestra en la Tabla 4.

El artículo de prueba o vehículo se administró por vía intravenosa en la vena auricular externa a una velocidad de inyección fija de 4 mL/min. La dosis se administró a cada animal en un volumen de dosis de 1 mL/kg de peso corporal.

A intervalos de 7 días, cada animal recibió el vehículo o una de las tres dosis del artículo de prueba, siguiendo el diseño cruzado que se describe en la Tabla 4.

Tabla 4: Diseño experimental del estudio sobre la evaluación de los efectos sobre la función cardiovascular en cerdos miniatura machos.

Grupo Número	Tratamiento: ^{175}Lu -PSMA-R2 (mg/kg)			
	1ro. Día 1	2ro. Día 8	3ro. Día 15	4to. Día 22
2	Vehículo	0,058	0,175	0,583
4	0,058	0,175	0,583	Vehículo
6	0,175	0,583	Vehículo	0,058
8	0,583	Vehículo	0,058	0,175

La tensión arterial sistólica, diastólica y media (SBP, DBP y MBP), la frecuencia cardíaca (HR), la temperatura corporal y el electrocardiograma de derivación II se registraron de forma continua, desde 1 hora antes de la administración hasta 24 h después de la dosificación. Se informaron datos hemodinámicos y electrocardiográficos antes de la dosis y a los 5, 15, 30 minutos y 1, 2, 4, 8 y 24 horas después de la dosis.

Los resultados del estudio se resumen en la Tabla 10.

Estudios de toxicidad en dosis únicas y repetidas.

Se han realizado estudios de toxicidad de dosis única y repetida con una solución de Lu-PSMA-R2. Los estudios preclínicos de toxicidad se realizaron en ^{175}Lu -PSMA-R2 como sustituto del ^{177}Lu -PSMA-R2.

El artículo de prueba ^{175}Lu -PSMA-R2 es una solución que contiene ^{175}Lu -PSMA-R2 y PSMA-R2 sin marcar, en tampón de acetato, en el que PSMA-R2 está en una concentración nominal de 1 mg/mL y está presente parcialmente en la forma libre (PSMA-R2) y parcialmente complejoado con Lu-175, donde la relación entre los dos es de alrededor de 1:1. La dosis se expresa como la suma de la forma libre y la forma marcada con 175 Lu.

Se han concluido los estudios de toxicidad de dosis única en ratas y cerdos miniatura, así como los estudios de toxicidad de dosis repetidas de 2 semanas en ratas.

Estudio de toxicidad de dosis única en ratas.

Este estudio tuvo como objetivo evaluar la toxicidad de ^{175}Lu -PSMA-R2 inmediatamente después de la inyección intravenosa aguda de 2 o 4 mg/kg entre ratas Sprague Dawley (SD).

Se administraron 2 y 4 mg/kg a dos grupos de 30 animales (relación macho:hembra de 1:1), respectivamente. Se trató con el vehículo un grupo de control de iguales características (Tabla 5).

Tabla 5: Diseño experimental del estudio de toxicidad de dosis única en la rata.

Grupo Número	Dosis de tratamiento (mg/kg)	Nivel de dosis	Volumen de inyección (mL/kg)	Nro. de ratas y género
1	0	Control	5	15M + 15F
2	2	Primero	5	15M + 15F

3	4	Segundo	5	5M
---	---	---------	---	----

Los signos de reacción al tratamiento en todas las dosis se evaluaron a los 30, 120 y 240 min p. i., así como 24 h más tarde. En el día 2, se sacrificaron 10 ratas por género y por grupo. Los 5 animales/género/grupo restantes se observaron diariamente durante 14 días.

5 El peso corporal se registró el día de la asignación al grupo de tratamiento, los días 1 (día de la inyección), 8 y 15. El consumo de alimentos se midió el día 2 y luego semanalmente. Al final del tratamiento, se recolectaron muestras de orina para el análisis de orina. Los días 2 y 15, las muestras de sangre extraídas en el momento del sacrificio se examinaron en busca de patologías clínicas. Después de la disección, los órganos se pesaron, 10 y los tejidos se trataron para análisis microscópicos (se analizaron más de 50 tejidos diferentes).

Los resultados del estudio se resumen en la Tabla 10. Sugieren que una sola administración intravenosa del artículo de prueba, ^{175}Lu -PSMA-R2, en niveles de dosis de 2 y 4 mg/kg (es decir, alrededor de 480 y 960 veces la dosis humana prevista, aumentada en 15 función de mg/kg, considerando un peso corporal humano de 60 kg) no indujo signos de toxicidad y, por lo tanto, es bien tolerada en ratas.

Estudio de toxicidad de dosis única en el cerdo miniatura.

20 La toxicidad y el perfil toxicocinético de ^{175}Lu -PSMA-R2 se investigaron en cerdos miniatura de Göttingen después de la administración intravenosa de un solo bolo de acuerdo con el diseño experimental detallado en la Tabla 6.

Se permitió un período libre de tratamiento de dos semanas después de la administración.

25 Todos los animales se administraron por vía intravenosa. Se recogieron muestras de plasma el día 1 para análisis toxicocinético.

Tabla 6: Diseño experimental del estudio de toxicidad de dosis única en el cerdo miniatura.

Grupo Número	Dosis de tratamiento (mg/kg)	Nivel de dosis	Volumen de inyección (mL/kg)	Número de cerdos miniatura y género
1	0	Control	2,5	3M + 3F
2	0,175	Primero	2,5	3M + 3F

3	0,583	Segundo	2,5	3M + 3F
4	1,750	Tercero	2,5	3M + 3F

La mortalidad, los signos clínicos, el peso corporal, el consumo de alimentos, las investigaciones de patología clínica, la oftalmoscopia, las evaluaciones de ECG y las observaciones macroscópicas se indexaron en la necropsia. Luego se pesaron los órganos seleccionados, y se recolectaron los tejidos.

Además, se recogieron muestras de plasma el día 1 para análisis toxicocinético.

Los resultados del estudio se resumen en la Tabla 10. Sugieren que una sola administración intravenosa del artículo de prueba, ^{175}Lu -PSMA-R2, en niveles de dosis de 0,175, 0,583 y 1,75 mg/kg (es decir, alrededor de 42, 140 y 420 veces la dosis humana prevista, aumentada sobre una base de mg/kg, considerando un peso corporal de 60 kg) no indujo signos de toxicidad en los cerdos miniatura. Por lo tanto, se puede concluir que el artículo de prueba es bien tolerado por los cerdos miniatura en estas cantidades.

Estudio de toxicidad de dosis repetidas en la rata.

El propósito de este estudio fue investigar la toxicidad de ^{175}Lu -PSMA-R2 en ratas después de la administración intravenosa diaria durante 2 semanas y la recuperación de cualquier efecto relacionado con el tratamiento durante un período de recuperación de 2 semanas (grupos principales).

Las dosis evaluadas fueron 0,13, 0,39 y 1,29 mg/kg/día, es decir, alrededor de 31, 93 y 310 veces la dosis humana anticipada de PSMA-R2.

Cada grupo de tratamiento principal consistió en 10 ratas macho y 10 ratas hembras. Se incluyeron 5 machos y 5 hembras adicionales para ser sacrificados después de 2 semanas de recuperación en los grupos 1 y 4. Dos grupos satélites (dosis baja y media) para la toxicocinética tenían 9 machos y 9 hembras, y un grupo (dosis alta) incluyó 12 machos y 12 hembras. Un grupo adicional (control) estaba compuesto por 3 animales machos y 3 hembras.

El diseño experimental se esquematiza en la Tabla 7 y la Tabla 8.

Tabla 7: Diseño experimental del estudio de toxicidad de dosis repetidas en la rata – grupos principales.

Grupo Número	Dosis de tratamiento (mg/kg/día)	Nivel de dosis	Volumen de inyección (mL/kg)	Nro. de ratas y género	
				Fase principal	Fase recuperación
1	0	Control	2,5	10M + 10F	5M + 5F
2	0,13	Bajo	2,5	10M + 10F	
3	0,39	Medio	2,5	10M + 10F	
4	1,29	Alto	2,5	10M + 10F	5M + 5F

Tabla 8: Diseño experimental del estudio de toxicidad de dosis repetidas en la rata – grupos satélite para evaluación de TK.

Grupo Número	Dosis de tratamiento (mg/kg/día)	Nivel de dosis	Volumen de inyección (mL/kg)	Número de ratas y género
5	0	Control	2,5	3M + 3F
6	0,13	Bajo	2,5	9M + 9F
7	0,39	Medio	2,5	9M + 9F
8	1,29	Alto	2,5	12M + 12F

5 En este estudio, se investigaron la toxicidad y el perfil toxicocinético de ^{175}Lu –PSMA–R2 en ratas Sprague Dawley después de la administración intravenosa diaria durante 2 semanas en dosificaciones de 0,13, 0,39 y 1,29 mg/kg/día. Se permitió un período sin tratamiento de 2 semanas, para los grupos de control y de dosis alta, para recuperarse de cualquier efecto relacionado con el tratamiento o de la persistencia de los efectos adversos

10 observados durante la fase de dosificación de 2 semanas.

No se registraron signos de importancia toxicológica en la observación clínica diaria. El peso corporal y el consumo de alimentos no fueron afectados por el tratamiento. No se observaron anomalías relacionadas con el tratamiento en el examen oftalmoscópico. No se encontraron hallazgos de relevancia toxicológica en el examen de patología clínica. No se

15 encontró evidencia de efectos relacionados con el tratamiento en la necropsia, el peso de los órganos o el examen histopatológico.

La evaluación toxicocinética mostró que todos los animales tratados con los tres niveles de dosis fueron expuestos al artículo de prueba. En general, la exposición fue

aproximadamente proporcional a la dosis. La exposición fue similar en hombres y mujeres. El fármaco se eliminó con una vida media de aproximadamente 0,4–0,8 horas considerando ambos sexos y todos los niveles de dosis. El aclaramiento fue independiente de la dosis, lo que sugiere un comportamiento cinético lineal. No se observó acumulación después de la administración diaria, desde el Día 1 hasta el Día 14.

Sobre la base de los resultados obtenidos en este estudio, no se observaron efectos tóxicos en los grupos mixtos tratados en comparación con los controles. Por lo tanto, 1,29 mg/kg/día pueden considerarse como el NOAEL (Nivel sin efectos adversos observados, conforme a sus siglas en inglés), que es 310 veces superior a la dosis humana prevista.

Los resultados del estudio se resumen en la Tabla 10.

Estudio de toxicidad de dosis repetidas en el cerdo miniatura.

El propósito de este estudio es investigar la toxicidad y el perfil toxicocinético de LuPSMA–R2 en cerdos miniatura después de la administración intravenosa diaria durante 2 semanas y la recuperación de cualquier efecto relacionado con el tratamiento durante un período de recuperación de 2 semanas.

Las dosis evaluadas son: 0,058, 0,175 y 0,583 mg/kg/día, que es alrededor de 14, 42 y 140 veces la dosis humana anticipada de PSMA–R2.

Cada grupo incluyó 3 cerdos miniatura machos y 3 hembras. Los grupos 1 y 4 incluyeron 2 animales adicionales por género para ser sacrificados después de 2 semanas de recuperación. El diseño experimental se resume en la Tabla 9.

A todos los animales se les administró una dosis intravenosa una vez por día durante 14 días consecutivos.

Tabla 9: Diseño experimental del estudio de toxicidad de dosis repetidas en el cerdo miniatura.

Grupo Número	Dosis de tratamiento (mg/kg/día)	Nivel de dosis	Volumen de inyección (mL/kg)	Número de cerdos miniatura y género	
				Fase principal	Fase recuperación
1	0	Control	1	3M + 3F	2M + 2F
2	0,058	Bajo	1	3M + 3F	
3	0,175	Medio	1	3M + 3F	
4	0,583	Alto	1	3M + 3F	2M + 2F

El peso corporal y la ingesta de alimentos no se vieron afectados por el tratamiento. El examen físico realizado no mostró cambios apreciables en ningún animal. No se detectaron anomalías relacionadas con el tratamiento en la oftalmoscopia ni en el examen electrocardiográfico. La patología clínica (es decir, hematología, coagulación, química sanguínea y análisis de orina), así como la patología macroscópica, el peso corporal terminal y el peso absoluto y relativo de los órganos no revelaron cambios notables o relacionados con el tratamiento en ninguna dosis, sin modificaciones de histopatología relacionadas con el tratamiento.

La evaluación toxicocinética mostró que todos los animales tratados con los tres niveles de dosis estuvieron expuestos al artículo de prueba. El Día 1, la vida media estimada de ^{175}Lu -PSMA-R2 fue de 0,71 y 0,63 horas, en cerdos miniatura machos y hembras, respectivamente, considerando la media de valores por sexo. Estos valores se confirmaron el Día 14. El aclaramiento plasmático fue independiente de la dosis, lo que sugiere un comportamiento cinético lineal. El aumento en la exposición sistémica (en términos de C_{max} y AUC_{0-túltimo}) fue aproximadamente proporcional a la dosis. No se observó acumulación relevante después de la administración diaria desde el Día 1 hasta el Día 14.

Los resultados de este estudio indican que 0,583 mg/kg/día pueden considerarse el NOAEL para este estudio.

Los resultados de los estudios de toxicología y farmacología de seguridad se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10: Resumen de los resultados obtenidos en los estudios de farmacología y toxicología de seguridad.

Estudio	Dosis (mg/kg) [veces de la dosis humana]	Estado/Resultados
Farmacología de seguridad: efectos sobre el SNC en ratas (prueba de Irwin)	0,2, 0,6, 2 mg/kg [48 x, 144 x, 480 x]	Sin efectos sobre los parámetros conductuales, neurológicos o autónomos hasta 24 h después de la dosis. No se produjeron muertes durante el estudio. No se observaron signos clínicos en el período de observación de 6 días.
Farmacología de seguridad: efectos	0,2, 0,6, 2 mg/kg	No se observaron cambios de importancia toxicológica en los parámetros respiratorios registrados durante las 4 horas posteriores a la inyección.

sobre la función respiratoria en ratas	[48 x, 144 x, 480 x]	
Evaluación del efecto sobre la tensión arterial, la frecuencia cardíaca, electrocardiograma y temperatura corporal en cerdos miniatura	0,058, 0,175, 0,58 mg/kg [14 x, 42 x, 140 x]	No se observaron cambios relevantes en la frecuencia cardíaca, la tensión arterial o la actividad electrocardiográfica en las dosis evaluadas en cerdos miniatura conscientes.
Toxicidad de dosis única extendida en ratas	2, 4 mg/kg [480 x, 960 x]	No se observaron signos de toxicidad. Una muerte a los 30 min después de la dosificación (dosis alta). No se pudo establecer la causa de muerte después del examen histopat. Solo se observó una disminución de la actividad en este animal (y en otros 5 animales del grupo de dosis alta) inmediatamente después de la dosificación. Conclusión: del artículo de prueba, ¹⁷⁵ Lu-PSMA-R2 no indujo signos de toxicidad después de una sola administración intravenosa, por lo que es bien tolerado en ratas.
Toxicidad de dosis única en cerdos miniatura	0,175, 0,58, 1,75 mg/kg [42 x, 140 x, 420 x]	No hay signos de toxicidad relevante relacionados con el tratamiento, el compuesto es bien tolerado en cerdos en miniatura en las dosis evaluadas. Sin signos físicos relacionados con el tratamiento, hallazgos oculares ni anomalías electrocardiográficas. Se observaron algunos cambios en la hematología y la química clínica en algunos animales del grupo de dosis alta. No se observaron cambios en el peso de los órganos ni cambios macroscópicos o microscópicos relacionados con el tratamiento.
Toxicidad de dosis repetida (2 semanas) en ratas	0,13, 0,39, 1,29 mg/kg [31 x, 93 x, 310 x]	No se encontraron pruebas de efectos relacionados con el tratamiento en los grupos tratados en comparación con los controles. Por lo tanto, 1,29 mg/kg/día podrían declararse como el NOAEL (Nivel sin efectos adversos observados).
Toxicidad de dosis repetida (2 semanas) en cerdos miniatura	0,058, 0,175, 0,58 mg/kg [14 x, 42 x, 10 x]	El compuesto fue bien tolerado en cerdos miniatura cuando se administró una vez por día durante 2 semanas consecutivas. No se encontraron pruebas de efectos relacionados con el tratamiento en los grupos tratados en comparación con los controles. Por lo tanto, 0,58 mg/kg/día podría declararse como el NOAEL (Nivel sin efectos adversos observados).

Estudios de genotoxicidad: Ensayo de mutación bacteriana.

Se examinó la capacidad de la solución del artículo de prueba PSMA–R2 marcado con ^{175}Lu para inducir mutaciones génicas en cepas de ensayo de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, medida mediante la reversión de las cepas auxotróficas a prototrofia. Se utilizaron las cinco cepas de prueba TA1535, TA1537, TA98, TA100 y WP2 uvrA. Los experimentos se realizaron tanto en ausencia como en presencia de activación metabólica, utilizando la fracción S9 de hígado de ratas pretratadas con fenobarbital y 5,6–benzoflavona.

El artículo de prueba se usó como una solución en tampón de acetato de sodio, y todas las concentraciones en este informe se expresan en términos de ingrediente activo. La solución del artículo de prueba PSMA–R2 marcado con ^{175}Lu se analizó en la prueba de toxicidad en una concentración máxima factible de 1000 $\mu\text{g/placa}$ y en cuatro concentraciones más bajas espaciadas a intervalos de aproximadamente medio logaritmo: 316, 100, 31,6 y 10,0 $\mu\text{g/placa}$. No se observó precipitación del artículo de prueba al final del período de incubación en ninguna concentración. No se observaron toxicidad ni aumentos relevantes en el número de revertientes con ninguna cepa de prueba en cualquier nivel de dosis, en ausencia o presencia del metabolismo de S9.

Sobre la base de los resultados obtenidos en la prueba preliminar de toxicidad, en el Ensayo principal, utilizando el método de incorporación de placa, el artículo de prueba se ensayó con todas las cepas de prueba en los siguientes niveles de dosis: 1000, 500, 250, 125 y 62,5 $\mu\text{g/placa}$. No se observó precipitación del artículo de prueba al final del período de incubación en ninguna concentración. No se observaron toxicidad ni aumentos relevantes en el número de revertientes con ninguna cepa de prueba en cualquier nivel de dosis, en ausencia o presencia del metabolismo de S9. Dado que se obtuvo un resultado claramente negativo, no se realizaron más experimentos.

Se concluye que la solución de artículo de prueba PSMA–R2 marcado con ^{175}Lu no induce una mutación inversa en *Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli* en ausencia o presencia del metabolismo de S9, en las condiciones experimentales informadas.

Estabilidad in vitro en plasma.

La estabilidad del ligando PSMA–R2 se evaluó *in vitro* después de la incubación con plasma de cuatro especies diferentes (ratón, rata, cerdo miniatura y humano). Se incubó PSMA–R2 a 37°C en las diferentes matrices, en una concentración final de 10 $\mu\text{g/mL}$,

durante 30, 60 y 120 minutos. Las muestras se analizaron mediante el método de LC–MS/MS.

PSMA–R2 mostró una buena estabilidad en plasma humano, con una recuperación del 85 % después de 2 horas.

5

Estudios de unión a proteína plasmática.

La unión a proteína plasmática de PSMA–R2 y ^{175}Lu –PSMA–R2 se ha determinado mediante el método de ultrafiltración, después de la incubación de los compuestos en plasma humano, de ratón, rata y cerdo miniatura en dos concentraciones diferentes: 1 y 5 $\mu\text{g/mL}$.

10 Los resultados (como porcentaje de la fracción no unida) se informan en la Tabla 11.

Tabla 11: Resultados de unión a proteína plasmática de PSMA–R2 expresados como porcentaje de la fracción no unida.

Especie	PSMA–R2 fu (%)		175Lu–PSMA–R2 fu (%)	
	1 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	
Humano	$23,0 \pm 0,5$	$29,9 \pm 4,6$	$45,0 \pm 9,6$	$43,9 \pm 5,1$
Ratón	$72,7 \pm 1,5$	$86,2 \pm 11,1$	$71,0 \pm 2,2$	$71,1 \pm 4,4$
Rata	$22,6 \pm 1,1$	$25,6 \pm 1,8$	$50,8 \pm 4,4$	$37,4 \pm 4,9$
Cerdo miniatura	$35,3 \pm 8,5$	$40,7 \pm 4,3$	$46,1 \pm 12,5$	$41,1 \pm 4,2$

15 Los resultados apoyan que ^{175}Lu –PSMA–R2 es un compuesto no altamente unido, la fracción no unida del PSMA–R2 no marcado o marcado con ^{175}Lu en el plasma humano varía de alrededor del 25 % al 45 %. Los resultados del plasma de cerdo miniatura y del plasma de rata de unión a proteína están en el mismo rango. El ratón mostró una unión a proteína más baja en comparación con las otras especies, donde la fracción no unida varió

20 de alrededor del 70 % al 86 %. En general, en todas las especies, los resultados en las dos concentraciones diferentes evaluadas son bastante similares.