

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 973**

51 Int. Cl.:

C07F 9/22	(2006.01)	A61K 31/66	(2006.01)
C07F 9/24	(2006.01)		
C07C 229/24	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
A61P 13/08	(2006.01)		
A61K 31/664	(2006.01)		
C07F 9/655	(2006.01)		
C07F 9/6561	(2006.01)		
C07F 9/09	(2006.01)		
C07F 9/40	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2007 E 07758547 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 1999136**

54 Título: **Inhibidores peptidomiméticos del PSMA, compuestos que los comprenden y métodos de utilización**

30 Prioridad:

14.03.2006 US 782211 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2013

73 Titular/es:

**CANCER TARGETED TECHNOLOGY LLC
(100.0%)
14241 Woodinville-Duvall Road, Suite 143
Woodinville, WA 98072, US**

72 Inventor/es:

BERKMAN, CLIFF

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 397 973 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores peptidomiméticos del PSMA, compuestos que los comprenden y métodos de utilización

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a pequeñas moléculas que tienen una alta afinidad y especificidad al antígeno membranario específico de la próstata (PSMA) y a los métodos para su utilización con fines de diagnóstico y terapéuticos.

Compendio de la técnica relacionada

- 10 El antígeno membranario específico de la próstata (PSMA) se sobreexpresa únicamente en la superficie de las células de cáncer de próstata, así como en los nuevos vasos sanguíneos de una variedad de tumores sólidos. Como resultado, el PSMA ha atraído la atención como biomarcador clínico para la detección y tratamiento del cáncer de próstata. En general, estos métodos utilizan un anticuerpo dirigido específicamente a PSMA para el diagnóstico por la imagen directo o a agentes terapéuticos. Por ejemplo, ProstaScint (Cytogen, Philadelphia, PA), que ha sido aprobado por la FDA para la detección y diagnóstico por la imagen de cáncer de próstata, utiliza un anticuerpo para
- 15 suministrar un radioisótopo quelado (Indio-111). Sin embargo, ahora se reconoce que la tecnología ProstaScint se limita a la detección de las células muertas y por lo tanto su relevancia clínica es cuestionable.

- 20 El éxito del diagnóstico y terapia del cáncer utilizando anticuerpos está limitado por cuestiones tales como la eliminación lenta de estas biomoléculas de la sangre y de la escasa permeabilidad vascular. Además, grandes anticuerpos unidos a dianas de la superficie celular presentan una barrera para la posterior unión de anticuerpos adicionales en los sitios de la superficie celular adyacentes dando como resultado una disminución del marcado de la superficie celular.

- 25 Además de servir como diana de la superficie celular para los anticuerpos que suministran diagnóstico o agentes terapéuticos, una propiedad subestimada en gran medida y única del PSMA es su actividad enzimática. Es decir, PSMA es capaz de reconocer y procesar moléculas tan pequeñas como dipéptidos. A pesar de la existencia de esta propiedad, ha sido poco explorada en gran medida en cuanto al desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico y terapéuticas. Hay unos pocos ejemplos recientes en la bibliografía que han descrito resultados en la detección de células de cáncer de próstata utilizando inhibidores de molécula pequeña marcados de PSMA.

Compendio de la invención

- 30 La presente invención comprende compuestos que se unen al antígeno membranario específico de la próstata (PSMA) con alta afinidad y especificidad. Debido a estas propiedades, los compuestos de la invención son útiles para suministrar agentes de diagnóstico o terapéuticos a las células presentadoras de PSMA o para capturar y detectar dichas células, tales como cuando los compuestos de la invención están anclados directa o indirectamente a un soporte sólido. Al mismo tiempo, por lo tanto, se describen métodos de diagnóstico para detectar y/o identificar las células presentadoras de PSMA que comprenden poner en contacto (o hacer que se ponga en contacto) una
- 35 célula sospechosa de presentar el PSMA con un compuesto de la invención unido a un marcador detectable o dispositivo de detección y determinar si el compuesto y la célula y están unidos. La invención también comprende composiciones que comprenden un compuesto de la invención junto con un vehículo, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Se describen también procedimientos de inhibición o tratamiento del cáncer de próstata que comprenden administrar a un paciente que tiene cáncer de próstata una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención unido a un agente terapéutico del cáncer de próstata (o una composición del mismo).
- 40

- Las moléculas pequeñas de la invención proporcionan una ventaja sobre los métodos que utilizan anticuerpos PSMA porque la preparación y purificación de moléculas pequeñas son más eficientes y más rentables que la preparación de anticuerpos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra análogos moleculares de poda de **T33**.

La figura 2 muestra inhibidores de fosforamidato de PSMA que contienen esteroides.

La figura 3 muestra la inhibición de PSMA en función del tiempo por **T33**

- 50 La figura 4 muestra la inhibición irreversible y lentamente reversible de **T33** y análogos moleculares de poda representativos.

La figura 5 muestra una clasificación de **T33** y sus análogos moleculares de poda como inhibidores irreversibles, lentamente reversibles y rápidamente reversibles de PSMA.

La figura 6 muestra transferencias de Western de PSMA tratado con T33 sobre (A) el aumento del tiempo y (B) aumento de la concentración.

La figura 7 muestra un análogo de bifenilo de MP1D.

5 La figura 8 muestra inhibidores sintéticos de PSMA diseñados tanto para la modificación en el grupo amino N-terminal como para el suministro de diagnóstico por la imagen y cargas terapéuticas a las células de cáncer de próstata.

La figura 9 muestra inhibidores de PSMA marcados con fluorescencia conocidos para marcar específicamente células de cáncer de próstata que expresan PSMA.

La figura 10 muestra una preparación representativa para inhibidores de PSMA marcados con fluorescencia.

10 La figura 11 muestra la preparación de un inhibidor **TL-LW-54-BnDTPA** de PSMA que lleva quelante.

La figura 12 muestra inhibidores de PSMA representativos marcados con biotina.

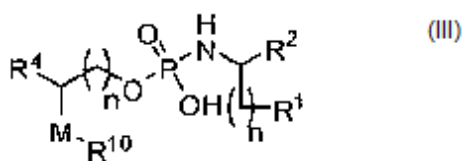
Descripción detallada de la invención

15 Se ha reconocido que pequeñas moléculas pueden alcanzar el tumor objetivo si poseen suficiente afinidad por células tumorales. Para ser competitivo con y sustancialmente equivalentes a los agentes de administración a base de anticuerpos, la afinidad de pequeñas moléculas deben estar en el mismo intervalo que el de los anticuerpos para sus dianas.

20 En un primer aspecto, la invención comprende moléculas pequeñas que se dirigen al PSMA (preferiblemente al sitio de reconocimiento enzimático del PSMA) que cumplen con este criterio. Una característica única de los compuestos de la invención es que proceden principalmente de un núcleo central de fosoramidato. Específicamente, dichos compuestos químicos incluyen todos los compuestos que se muestran en la figura 1 (Excepto CCS, JM139 y 2-PMPA), la figura 2 y las figuras 7 - 12. Los compuestos de la invención tienen generalmente IC₅₀ inferior a 5 μM, preferiblemente inferior a 1 μM, y más preferiblemente inferior a 100 nM, medida según el ensayo descrito en los ejemplos (véase más adelante).

25 Los compuestos de la invención tienen tres componentes que dan como resultado un potente inhibidor peptidomimético de PSMA que también se pueden funcionalizar para suministrar un agente de diagnóstico o terapéutico a células que expresan PSMA: 1) glutamato o un análogo de glutamato en la posición P1', 2) un fosoramidato central o análogo de fosoramidato como grupo de unión al cinc, y 3) una serina o análogo de serina en la posición P1 conectado por su cadena lateral y, preferiblemente, que posee un grupo hidrófobo en su N-terminal o N-terminal equivalente.

30 En un primer aspecto, la invención proporciona el compuesto de fórmula (III),



y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que

cada n es independientemente 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

35 cada R¹ y R² son independientemente -C(O)OR³, -C(O)N(R³)₂, -P(O)(OR³)₂, -OP(O)(OR³)₂, -S(O)₂R³, -S(O)₂OR³, -S(O)₂N(R³)₂ o tetrazolilo;

cada R³ es independientemente -H o alquilo C₁-C₆;

R⁴ es -H, -C(O)OR³, -C(O)N(R³)₂, -P(O)(OR³)₂, -OP(O)(OR³)₂, -S(O)₂R³, -S(O)₂OR³, -S(O)₂N(R³)₂, o tetrazolilo;

M es -O-, -S-, -N(R³)- o -CH₂-;

40 R¹⁰ es -H, alquilo C₁-C₆, -aril-arilo, -XR⁶, -R⁷, -C(O)R⁵, -S(O)₂R⁵, un péptido que tiene dos a diez restos de aminoácidos, un dendrímero o un dendrímero peptídico en el que

X es -O-, -S- o -N(R³)-;

R⁵ es -CH(R⁵¹)N(R⁵²)₂;

alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con 1 a 3 grupos que son independientemente -halógeno, COOR⁵³, -N(R⁵²)₂;

o heteroarilo, en el que

5 R⁵¹ es -H, arilo, heteroarilo, alquil-arilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con -OH; alquil-heteroarilo C₁-C₆, o alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con -OR⁵³, -SR⁵³, -NH₂, -N(H)C(=NH)NH₂, -COOR⁵³ o -C(O)N(R⁵³)₂; y

R⁵² es -H, alquilo C₁-C₆, -C(O)R⁵³, C(O)OR⁵³, -C(O)NH(alquilo C₁-C₆), -C(O)N(R⁵³)₂, o -C(O)heteroarilo;

R⁵³ es -H o alquilo C₁-C₆;

10 R⁶ es -H o alquilo C₁-C₆;

y

R⁷ es -L¹-R⁸, en el que

L¹ es -C(O)N(R³)-, -C(S)N(R³)-, -C(O)CH(R²¹)-, -C(O)(O) o -C(O)-L²-, en la que

15 C₆ R²¹ es -H, heteroarilo, alquilo-arilo C₁-C₆ sustituido con -OH; alquil-heteroarilo C₁-C₆, o alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con -OR²³, -SR²³, -NH₂, -N(H)C(=NH)NH₂, -COOR²³ o -C(O)N(R²³)₂; y

R²³ es -H o alquilo C₁-C₆;

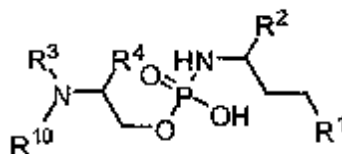
L² es -alquilo C₁-C₂₄- o -fenil-alquilo C₁-C₂₄-, en el que

20 cada grupo alquilo está opcionalmente sustituido con 1 a 4 grupos que son oxo, =S o -COOH; y

uno a seis de los grupos metileno en cada grupo alquilo está opcionalmente sustituido por -O-, -S- o -N(R³)-, a condición de que ninguno de los dos grupos metileno adyacentes estén sustituidos por -O-, -S-, o -N(R³)-; y

R⁸ es -H, -NH₂ u -OH.

En una realización preferida del primer aspecto, la invención proporciona el compuesto de fórmula (IV),



25 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que cada variable es como se define para la fórmula (III).

En una realización preferida de fórmulas (III) - (IV), R¹ y R² son cada uno -C(O)OH.

En una realización preferida de fórmulas (III) - (IV), R⁴ es -C(O)OH.

En una realización más preferida de fórmulas (III) - (IV), R¹, R² y R⁴ son cada uno C-(O)OH.

30 En una realización más preferida de las fórmulas (III) - (IV), R¹⁰ es R⁷.

En una realización más preferida de las fórmulas (III) - (IV), R¹⁰ es R⁷, en el que

R⁷ es -L¹-R⁸, en el que

L¹ es -C(O)-L²-, en el que

L² es -alquilo -C₁-C₂₄ o -fenilo-alquilo C₁-C₂₄-, en el que

35 cada grupo alquilo está opcionalmente sustituido con 1 a 4 grupos que son oxo, =S o -COOH; y

uno a seis de los grupos metileno en cada grupo alquilo está opcionalmente sustituido por -O-, -S- o -N(R³)-; a condición de que ninguno de los dos grupos metileno adyacentes estén ambos sustituidos por -O-, -S- o -N(R³)-; y

R⁸ es -H, -NH₂ u -OH.

5 En una realización más preferida de las fórmulas (III) - (IV), R¹⁰ es R⁷, en el que R⁷ es -L¹-R⁸, en el que

L¹ es -C(O)-L²-, en el que

L² es -alquilo C₁-C₂₄- o -fenil-alquilo C₁-C₂₄-, en el que

cada grupo alquilo está opcionalmente sustituido con 1 a 4 grupos que son oxo o -COOH; y

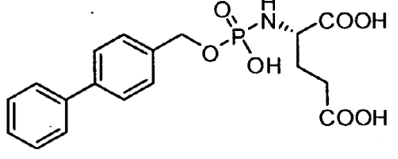
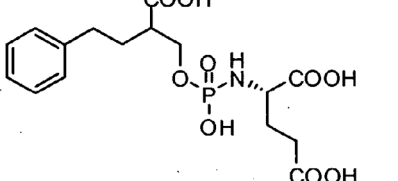
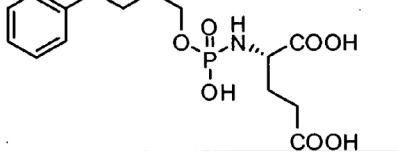
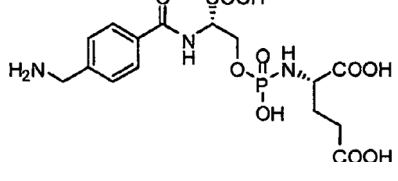
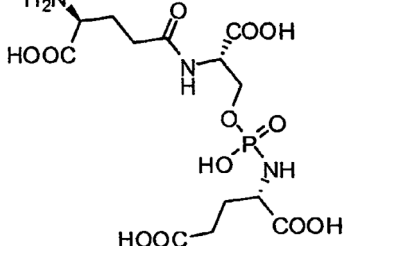
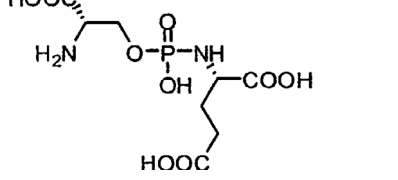
10 uno a seis de los grupos metileno en cada grupo alquilo está opcionalmente sustituido por -O- o -N(R³)-, a condición de que ninguno de los dos grupos metileno adyacentes estén ambos sustituidos por -O- o -N(R³)-; y

R⁸ es -H, -NH₂ u -OH.

En una realización más preferida de las fórmulas (III) - (IV), R¹⁰ es un péptido, dendrímero, o dendrímero peptídico.

15 Se describen compuestos que son

Compuesto	Denominación	Estructura
T33	Ácido N-[[2-(benzoilamino)-2-carboxietoxi](hidroxi)fosforil]-L-glutámico	
L36	Ácido N-[[2-(benzoil(metil)amino)-2-carboxietoxi](hidroxi)fosforil]-L-glutámico	
TC5074	Ácido N-[[2-(benzoilamino)etoxi](hidroxi)fosforil]-L-glutámico	
L101	Ácido N-[[2-(benzoil(metil)amino)etoxi](hidroxi) fosforil]-L-glutámico	

Compuesto	Denominación	Estructura
NC-2-29	Ácido <i>N</i> -[(bifenil-4-ilmetoxi)(hidroxi)fosforil]-L-glutámico	
MP1E	Ácido <i>N</i> -[(2-carboxi-4-fenilbutoxi)(hidroxi)fosforil]-L-glutámico	
MP1D	Ácido <i>N</i> -[hidroxi(4-fenilbutoxi)fosforil]-L-glutámico	
LW-5-40	Ácido <i>N</i> -{[(2 <i>S</i>)-2-(aminometil)benzoil]amino}-2-carboxietoxi(hidroxi)fosforil}-L-glutámico	
LW-54	L- γ -glutamil-O-[[<i>(1S)</i> -1,3-dicarboxipropil]amino](hidroxi)fosforil]-L-serina	
LW-5-40	Ácido <i>N</i> -{[(2 <i>S</i>)-2-[4-(aminometil)benzoil]amino]-2-carboxietoxi(hidroxi)fosforil}-L-glutámico	

Compuesto	Denominación	Estructura
LW-II-108	Ácido <i>N</i> -{[(2 <i>S</i>)-20-amino-2-carboxi-4,8-dioxo-6,12,15,18-tetraoxa-3,9-diazoicos-1-il]oxi}(hidroxi)fosforil]-L-glutámico	

5 En un segundo aspecto, la invención comprende compuestos híbridos que comprenden un compuesto según el primer aspecto de la invención unido por enlace covalente a un marcador detectable, agente terapéutico, o anclaje biomolecular unido a un soporte sólido. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen placas de 96 pocillos recubiertas con polilisina, anhídrido maleico o estreptavidina disponibles en el mercado. Otros soportes sólidos incluyen chips detectores recubiertos de oro o chips detectores recubiertas de oro funcionalizados disponibles en el mercado. El segundo aspecto de la invención proporciona el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo como en la reivindicación 6.

10 En una realización, el marcador detectable es un marcador fluorescente. Los marcadores fluorescentes habituales incluyen colorantes Alexa Fluor, colorantes BODIPY, colorantes a base de fluoresceína, colorantes a base de rodamina, colorantes a base de cumarina y colorantes a base de pireno.

En otra realización, el marcador detectable es una mitad de un par de unión específica, p. ej., la biotina del par de unión biotina-estreptavidina. Agentes representativos de pares de unión y anclajes biomoleculares incluyen biotina, oligonucleótidos de ADN o ARN o lípidos.

15 En otra realización, el marcador detectable es una estructura quelante capaz de unir radioisótopos tales como ⁹⁹Tc o agentes de contraste de MRI tal como Gd. Los agentes quelantes habituales incluyen DOTA, DTPA, CHX-A⁺, PCTA, y DO3A.

20 Pueden utilizarse marcadores fluorescentes, agentes de pares de unión, y agentes quelantes, y anclajes biomoleculares convencionales tal como se describe en la presente memoria. El procedimiento habitual conocido por los expertos en la técnica puede emplearse para unir los compuestos de la invención a dichos agentes y anclajes, así como a los agentes terapéuticos.

25 Los agentes terapéuticos son preferiblemente compuestos que interfieren con uno o más procesos biológicos de las células que presentan PSMA y, por lo tanto, tratan o inhiben una enfermedad asociada a la célula presentadora de PSMA. Los agentes terapéuticos pueden incluir opcionalmente radioisótopos citotóxicos quelados o unidos por enlace covalente, tales como ⁹⁰Y o ¹⁸⁸Re, dicho enlace quelante o covalente puede ser por medios conocidos por cualquier experto en la técnica.

30 Los agentes terapéuticos incluyen los que aumentan la inmunogenicidad de las células tumorales bien por enlace directo a la superficie celular de las células cancerosas o modulando la expresión de péptidos antigénicos en células cancerosas. Agentes seleccionados para el enlace covalente poseerán conocidas propiedades anticancerosas, antiproliferantes, o citotóxicas. Alternativamente, dichos agentes poseerán propiedades conocidas que estimulan o aumentan la inmunogenicidad de las células como una diana para inmunovigilancia de los linfocitos T.

35 Los agentes terapéuticos también incluyen, pero no se limitan a agentes a base de esteroides tales como 2-metoxiestradiol, mifepristona, tamoxifeno, inductores de apoptosis tales como el ácido retinoico, inhibidores de histona desacetilasa, tales como el butirato, inductor de apoptosis o ARNsi citotóxico tal como PIK1 ARNsi, agentes antimetabólicos tales como doxorubicina, antimetabolitos tales como metotrexato, y nanopartículas o liposomas diseñados para encapsular un fármaco citotóxico.

Se describe también en la presente memoria un compuesto de fórmula, A-L-B, en la que

A es el glutamato o un análogo de glutamato;

L es un fosforamidato o un análogo de fosforamidato;

B es serina o un análogo de serina,

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en el que

- 5 el compuesto está unido por enlace covalente mediante un enlazador divalente a un marcador detectable, agente terapéutico, o anclaje biomolecular unido a un soporte sólido en cualquier posición sustituible del compuesto.

En una forma de realización del segundo aspecto, el enlazador divalente procede de un aminoácido, oligopéptido, poli(etilen)glicol, oligoetilenglicol y similares.

- 10 En una forma de realización del segundo aspecto, el compuesto está unido por enlace covalente a un marcador detectable.

En otra realización del segundo aspecto, el compuesto está unido por enlace covalente a un agente terapéutico.

En otra realización del segundo aspecto, el compuesto está unido por enlace covalente a un anclaje biomolecular unido a un soporte sólido.

- 15 En una realización preferida del segundo aspecto, el compuesto está unido por enlace covalente a un marcador detectable, en el que el marcador detectable es un marcador fluorescente.

En otra realización preferida del segundo aspecto, el compuesto está unido por enlace covalente a un marcador detectable, en el que el marcador detectable es una estructura quelante unida a un radioisótopo o agente de contraste de diagnóstico por la imagen por resonancia magnética.

También se describe en la presente memoria el compuesto de fórmula (VI),



y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en las que

cada n es independientemente 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

- 25 cada R¹ y R² son independientemente -C(O)OR³, -C(O)N(R³)₂, -P(O)(OR³)₂, -OP(O)(OR³)₂, -S(O)₂R³, -S(O)₂OR³, -S(O)₂N(R³)₂ o tetrazolilo;

cada R³ es independientemente -H o alquilo C₁-C₆;

R⁴ es -H, -C(O)OR³, -C(O)N(R³)₂, -P(O)(OR³)₂, -OP(O)(OR³)₂, -S(O)₂R³, S(O)₂OR³, -S(O)₂N(R³)₂ o tetrazolilo;

L es -P(O)(OR³)-, -P(O)(N(R³)₂)-, -S(O)₂-, -C(O)- o -C(S)-;

M y T son independientemente -O-, -S-, -N(R³)-, o -CH₂-;

- 30 R⁷ es -X-R⁸ o L¹-R⁸, en el que

X es -C(O)-, -S(O)₂-, -O-, -S- o -N(R³)-;

L¹ es -C(O)N(R³)-, -C(S)N(R³)-, -C(O)CHR²¹-, -C(O)(O), -C(O)-L²-, un péptido, un dendrímero, o dendrímero peptídico, en el que

- 35 R²¹ es -H, arilo, heteroarilo, alquilo-arilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con -OH; alquil-heteroarilo C₁-C₆, o alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con -OR²³, -SR²³, -NH₂, -N(H)C(=NH)NH₂, -COOR²³ o -C(O)N(R²³)₂; y

R²³ es -H, alquilo C₁-C₆, o alquilo-arilo C₁-C₆;

L² es -alquilo C₁-C₂₄- o fenil-alquilo C₁-C₂₄, en el que

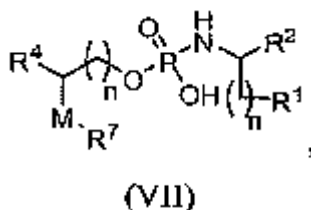
cada grupo alquilo está opcionalmente sustituido con 1 a 4 grupos que son oxo,=S, o -COOH; y

uno a seis de los grupos de metileno en cada grupo alquilo está opcionalmente sustituido por -O-, -S-, o -N(R³)-, a condición de que ninguno de los dos grupos metileno adyacentes se sustituyen por -O-, -S- o -N(R³)-; y

R⁸ es un agente terapéutico, marcador detectable, o anclaje biomolecular unido a un soporte sólido; y

5 Q es -O-, -S-, -N(R³)O-, -ON(R³)-, -CH₂- o =NO-.

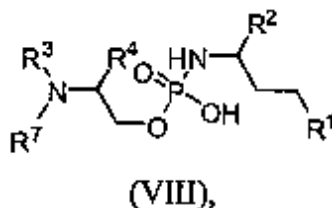
Se describe también el compuesto de fórmula (VII),



y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, en la que cada variable es como se define para la fórmula (VI).

Se describe también el compuesto el compuesto de fórmula (VIII),

10



y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, en la que cada variable es como se define para la fórmula (VI).

En una realización de fórmulas (VI) - (VIII), R¹ y R² son cada uno -C(O)OH.

En una realización de fórmulas (VI) - (VIII), R⁴ es -C(O)OH.

15 En una realización de fórmulas (VI) - (VIII), R¹, R² y R⁴ son cada uno -C(O)OH.

En una realización de fórmulas (VI) - (VIII), L¹ es -C(O)-L²-, en la que

L² es -alquilo C₁-C₂₄- o-fenil-alquilo C₁-C₂₄-, en el que

cada grupo alquilo está opcionalmente sustituido con 1 a 4 grupos que son oxo,=S o -COOH; y

20 uno a seis de los grupos metileno en cada grupo alquilo está opcionalmente sustituido por -O-, -S-, o -N(R³)-, a condición de que ninguno de los dos grupos metileno adyacentes estén ambos sustituidos por -O-, -S- o -N(R³)-.

En una realización de fórmulas (VI) - (VIII), L¹ es -C(O)-L²-, en el que

L² es alquilo C₁-C₂₄- o-fenil-alquilo C₁-C₂₄-, en el que

cada grupo alquilo está opcionalmente sustituido con 1 a 4 grupos que son oxo o -COOH; y

25 uno a seis de los grupos metileno en cada grupo alquilo está opcionalmente sustituido por -O- o -N(R³)-, a condición de que ninguno de los dos grupos metileno adyacentes estén reemplazados ambos por -O- o -N(R³)-.

En una realización de fórmulas (VI) - (VIII), L¹ es un péptido, dendrímero, o dendrímero peptídico.

En una realización de fórmulas (VI) - (VIII), R⁸ es un marcador detectable.

En una realización de fórmulas (VI) - (VIII), R⁸ es un anclaje biomolecular unido a un soporte sólido.

30 En una realización de fórmulas (VI) - (VIII), R⁸ es un marcador detectable, en el que el marcador es un colorante fluorescente.

En una realización de fórmulas (VI) - (VIII), R^8 es un marcador detectable, en el que el marcador es un colorante fluorescente, en el que el colorante fluorescente es Alexa Fluor, BODIPY, fluoresceínas, rodamina, cumarina o colorante a base de pireno.

5 En una realización de fórmulas (VI) - (VIII), R^8 es un marcador detectable, en el que el marcador es un colorante fluorescente, en el que el colorante fluorescente es fluoresceína o un derivado de fluoresceína.

En una realización de fórmulas (VI) - (VIII), R^8 es un marcador detectable, en el que el marcador es un agente quelante.

En una realización de fórmulas (VI) - (VIII), R^8 es un marcador detectable, en el que el marcador es un agente quelante, en el que el agente quelante es DOTA, DTPA, CHX-A", PCTA, y DO3A.

10 En una realización de fórmulas (VI) - (VIII), R^8 es R^9 , en el que

R^9 es alquilo C_1-C_6 , arilo o alquil C_1-C_6 -arilo, en el que R^9 está sustituido con uno a tres grupos que son independientemente $-COOH$ o $N(R^{91})_2$, en el que

cada R^{91} es independientemente $-H$ o alquilo C_1-C_6 sustituido con 1 a 3 grupos que son independientemente $-COOH$ o $-N(R^{92})_2$ en el que

15 cada R^{92} es independientemente $-H$ o alquilo C_1-C_6 sustituido con 1 a 3 $COOH$.

En una realización de fórmulas (VI) - (VIII), R^8 es un marcador detectable, en el que el marcador es una mitad de un par de unión específico.

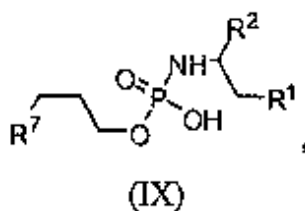
20 En una realización de fórmulas (VI) - (VIII), R^8 es un marcador detectable, en el que el marcador es una mitad de un par de unión específico, en el que una mitad del par de unión específico es biotina, un oligonucleótido de ADN o ARN o un lípido.

En una realización de fórmulas (VI) - (VIII), R^8 es un marcador detectable, en el que el marcador es una mitad de un par de unión específica, en el que una mitad del par de unión específico es biotina.

En una realización de fórmulas (VI) - (VIII), R^8 es un agente terapéutico.

25 En una realización más preferida de fórmulas (VI) - (VIII), R^8 es un grupo esteroideo opcionalmente sustituido con 1 a 5 grupos seleccionados del grupo que consiste en alquilo C_1-C_{10} , oxo, hidroxilo o halógeno.

En otra realización del primer aspecto, la invención proporciona el compuesto de fórmula (IX),

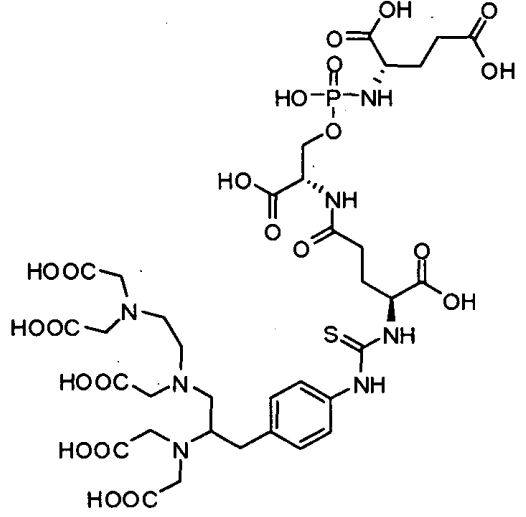
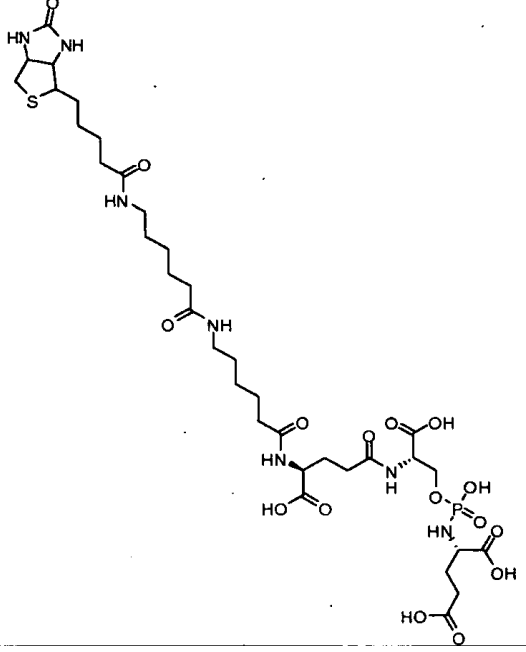


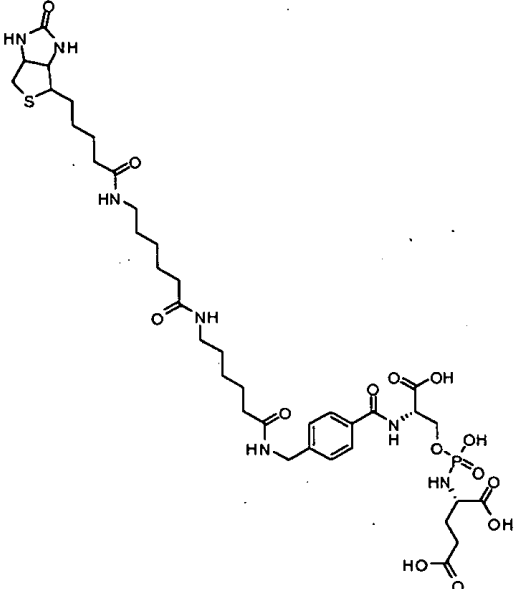
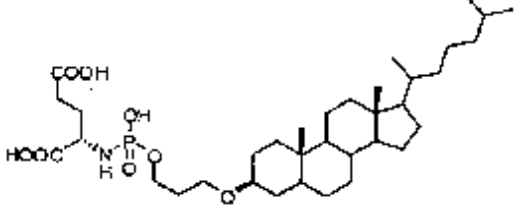
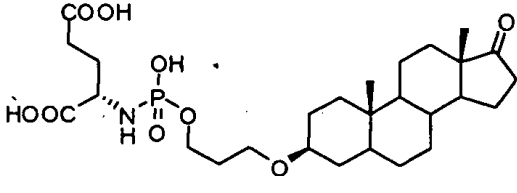
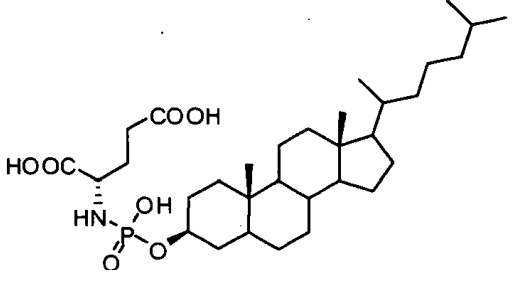
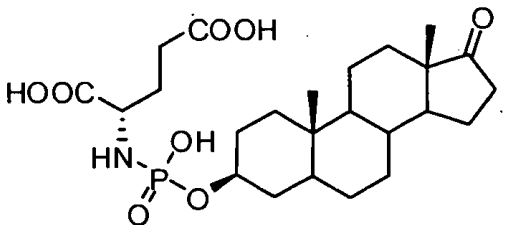
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que

30 R^7 es $-O-R^8$, en el que R^8 es un grupo esteroideo opcionalmente sustituido con 1 a 5 grupos seleccionados del grupo que consiste en alquilo C_1-C_{10} , oxo, hidroxilo, o halógeno, y cada variable restante es como se define en la reivindicación 7.

35 En una realización más preferida del primer aspecto, la invención proporciona los compuestos según la fórmula definida en la reivindicación 7, que se mencionan en la tabla siguiente como LW-39F5EX, LW-39-5FAMX, LW-54-F5EX, LW-54-5FAMX, L6-VI-21, TL-LW-54-BnDTPA, TL-LW-54-LC-LC-Biotina, TL-LW-39-LC-LC-Biotina, LW-S-120A1, LW-S-120A3, LW-A-152 Y LW-A-151.

Compuesto	Denominación	Estructura
LW-39F5EX	Ácido <i>N</i> -{[(2 <i>S</i>)-2-carboxi-2-({4-[[{3-[[2-[[3-carboxi-4-(6-hidroxi-3-oxo-9,9a-dihidro-3 <i>H</i> -xanten-9-il)fenil]amino]-2-oxoetil]tio]propanoil)amino]metil]benzoil)amino] etoxi}(hidroxi)fosforil]-L-glutámico	
LW-39-5FAMX	Ácido <i>N</i> -{[(2 <i>S</i>)-2-carboxi-2-[(4-[[{6-[[3-carboxi-4-(6-hidroxi-3-oxo-9,9a-dihidro-3 <i>H</i> -xanten-9-il)benzoil]amino}hexanoil)amino]metil]benzoil)amino]etoxi}(hidroxi)fosforil]-L-glutámico	
LW-54-F5EX	<i>N</i> -{3-[[2-[[3-carboxi-4-(6-hidroxi-3-oxo-9,9a-dihidro-3 <i>H</i> -xanten-9-il)fenil]amino]-2-oxoetil]tio]propanoil]-L- γ -glutamil-O-[[[(1 <i>S</i>)-1,3-dicarboxipropil]amino]}(hidroxi)fosforil]-L-serina	
LW-54-5FAMX	<i>N</i> -(6-[[3-carboxi-4-(6-hidroxi-3-oxo-9,9a-dihidro-3 <i>H</i> -xanten-9-il)benzoil]amino]hexanoil)-L- γ -glutamil-O-[[[(1 <i>S</i>)-1,3-dicarboxipropil]amino]}(hidroxi)fosforil]-L-serina	
L6-VI-21	Ácido <i>N</i> -{[(2 <i>S</i>)-2-carboxi-2-[[{3-carboxi-4-(6-hidroxi-3-oxo-9,9a-dihidro-3 <i>H</i> -xanten-9-il)fenil]amino]carbonotioil]amino]etoxi}(hidroxi)fosforil]-L-glutámico	

Compuesto	Denominación	Estructura
<p>TL-LW-54-BnDTPA</p>	<p><i>N</i>-{[(4-{2-[bis(carboximetil)amino]-3-[[2-[bis(carboximetil)amino]etil](carboximetil)amino]propil]fenil)amino]carbonotioil)-L-γ-glutamil-O-[[[(1<i>S</i>)-1,3-dicarboxipropil]amino](hidroxi)fosforil]-L-serina</p>	
<p>TL-LW-54-LC-LC-Biotina</p>	<p><i>N</i>-{6-[(6-[[5-(2-oxohexahidro-1<i>H</i>-tieno[3,4-<i>d</i>]imidazol-4-il)pentanoil]amino]hexanoil)amino]hexanoil)-L-γ-glutamil-O-[[[(1<i>S</i>)-1,3-dicarboxipropil]amino](hidroxi)fosforil]-L-serina</p>	

Compuesto	Denominación	Estructura
TL-LW-39-LC-LC-Biotina	Ácido <i>N</i> -{[(2 <i>S</i>)-2-carboxi-2-({4-[[{6-[[5-(2-oxohexahidro-1 <i>H</i> -tieno[3,4- <i>d</i>]imidazol-4-il)pentanoil]amino}hexanoil]amino]hexanoil]amino]metil]benzoil]amino)etoxi](hidroxi)fosforil]-L-glutámico	
LW-S-120A1	Ácido <i>N</i> -{[3-[(3β,8ξ,9ξ,14ξ,17ξ,20ξ)-coleston-3-iloxi]propoxi](hidroxi)fosforil]-L-glutámico	
LW-S-120A3	Ácido <i>N</i> -[hidroxi(3-[[3β,8ξ,9ξ,14ξ]-17-oxoandrostan-3-il]oxi)propoxi]fosforil]-L-glutámico	
LW-A-149	Ácido <i>N</i> -{[(3β,8ξ,9ξ,14ξ,17ξ,20ξ)-coleston-3-iloxi](hidroxi)fosforil]-L-glutámico	
LW-S-120A2	Ácido <i>N</i> -(hidroxi{[(3β,8ξ,9ξ,14ξ)-17-oxoandrostan-3-il]oxi}fosforil)-L-glutámico	

Compuesto	Denominación	Estructura
LW-A-152	Ácido N-[hidroxi(3-[[17-oxoestra-1(10),2,4-trien-3-il]oxi]fosforil)-L-glutámico	
LW-A-151	Ácido N-[(3-[[3-(benzoiloxi)estra-1(10),2,4-trien-17-il]oxi]propoxi)(hidroxi)fosforil]-L-glutámico	

y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En un tercer aspecto, la invención comprende una composición que comprende un compuesto híbrido según el segundo aspecto de la invención, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 5 En un cuarto aspecto, la invención comprende un kit de diagnóstico que comprende un compuesto híbrido según el segundo aspecto de la invención. En una forma de realización según este aspecto de la invención, el marcador detectable o anclaje biomolecular es un miembro de un par de unión específico (por ejemplo, biotina) y el kit comprende el otro miembro del par de unión específico.

- 10 En un quinto aspecto, la invención comprende un método de detección de células presentadoras del PSMA, comprendiendo el método poner en contacto células sospechosas de presentar el PSMA con un compuesto híbrido según el segundo aspecto de la invención y la medición de la presencia del marcador detectable en condiciones en las que el marcador detectable se detecta sólo cuando está unido a una célula presentadora de PSMA. Cómo se detecta el marcador detectable, por supuesto, dependerá del marcador que se utilice y será evidente para los expertos en la técnica. Por ejemplo, si el marcador detectable es un marcador fluorescente en el infrarrojo próximo, la detección del marcador puede llevarse a cabo con diagnóstico por la imagen de fluorescencia *in vivo*.

- 15 En la presente memoria se describe un método para inhibir o tratar una enfermedad que implica las células presentadoras del PSMA que comprende poner en contacto las células o dar lugar a que las células se pongan en contacto con un compuesto según el segundo aspecto de la invención o una composición según el tercer aspecto de la invención en el que el compuesto híbrido comprende un compuesto según el primer aspecto de la invención unido por enlace covalente a un agente terapéutico. En una realización este método comprende administrar la composición a un mamífero (preferiblemente humano) que tiene una enfermedad que implica células presentadoras del PSMA en una cantidad eficaz para inhibir o tratar la enfermedad. Las formulaciones y métodos de administración apropiados pueden determinarse de forma rutinaria utilizando métodos normalizados. Un sexto aspecto de la invención proporciona el compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33 para su utilización en medicina. La invención proporciona además la utilización tal como se define en la reivindicación 38.

- 20 En un séptimo aspecto, la invención comprende un método *in vitro* para capturar, detectar y cuantificar células presentadoras del PSMA, método que comprende poner en contacto células sospechosas de presentar el PSMA con un compuesto híbrido según el segundo aspecto de la invención y detectar las células presentadoras del PSMA capturadas o inmovilizadas. En una forma de realización preferida del séptimo aspecto, el compuesto híbrido del segundo aspecto está unido a un anclaje biomolecular en un soporte sólido. Cómo se detectan las células, por supuesto, depende del dispositivo detector que se utilice y resultará evidente para los expertos en la técnica. Por ejemplo, si el compuesto híbrido según el segundo aspecto de la invención está unido a un soporte sólido, la detección de las células presentadoras del PSMA se puede realizar directamente utilizando la resonancia de plasmón o puede llevarse a cabo una vez que las células se liberan y se marcan con un marcador fluorescente utilizando citometría de flujo.

Dendrimeros representativos que pueden utilizarse en la invención se describen en J. M. J. Fréchet, D. A. Tomalia, *Dendrimers and Other Dendritic Polimers*, John Wiley & Sons, Ltd. NY, NY (2002).

Los compuestos representativos útiles en la combinación de la presente invención incluyen los compuestos descritos anteriormente, y sus sales de adición de ácido y de base farmacéuticamente aceptables y uno de sus solvatos. Si el compuesto de la invención se obtiene como una sal de adición de ácido, la base libre puede obtenerse basificando una solución de la sal de ácido. Por el contrario, si el producto es la base libre, una sal de adición, específicamente una sal de adición farmacéuticamente aceptable, puede producirse disolviendo la base libre en un disolvente orgánico adecuado y tratando la solución con un ácido, según procedimientos convencionales para la preparación de sales de adición de ácido a partir de compuestos básicos.

Las sales farmacéuticas inocuas incluyen sales de ácidos tales como clorhídrico, fosfórico, bromhídrico, sulfúrico, sulfinico, fórmico, toluensulfónico, metansulfónico, nítrico, benzoico, cítrico, tartárico, maleico, yodhídrico, alcanico tal como acético, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ donde n es 0-4, y similares. Las sales de adición de bases farmacéuticas inocuas incluyen sales de bases tales como de sodio, potasio, calcio, amonio, y similares. Los expertos en la técnica reconocerán una amplia variedad de sales de adición inocuas farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de la invención y/o las composiciones de los mismos encuentran un uso específico en la inhibición y/o tratamiento de enfermedades relacionadas con el PSMA en animales y seres humanos. Por consiguiente, en la presente invención se describe la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos de la invención o de composiciones que contienen uno o más compuestos de la invención a un paciente en necesidad de dicho tratamiento para enfermedades relacionadas con el PSMA. Preferiblemente, el paciente es un mamífero, aún más preferiblemente un ser humano. Cuando se emplean en este contexto, los compuestos se pueden administrar por sí mismos, pero normalmente se formulan y administran en forma de composición farmacéutica. La composición exacta dependerá, entre otras cosas, del método de administración y será evidente para los expertos en la técnica. Se describe una amplia variedad de composiciones farmacéuticas adecuadas, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 20ª ed., 2001).

Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden consistir en (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz del compuesto activo en suspensión en diluyentes, tales como agua, solución salina o PEG 400; (b) cápsulas, bolsitas o comprimidos, que contienen cada uno una cantidad predeterminada de principio activo, como líquidos, sólidos, gránulos o gelatina; (c) suspensiones en un líquido apropiado, y (d) emulsiones adecuadas. Las formas de comprimido pueden incluir una o más de lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, fosfatos de calcio, almidón de maíz, almidón de patata, celulosa microcristalina, gelatina, dióxido de silicio coloidal, talco, estearato de magnesio, ácido esteárico, y otros excipientes, colorantes, cargas, aglutinantes, diluyentes, agentes tamponantes, agentes humectantes, conservantes, agentes aromatizantes, colorantes, agentes disgregadores, y vehículos farmacéuticamente compatibles. Formas de pastilla pueden comprender el principio activo en un aroma, p. ej., sacarosa, así como pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte, tales como gelatina y glicerina o emulsiones de sacarosa y acacia, geles, y similares que contienen, además de los principio activo, portadores conocidos en la técnica.

El compuesto de elección, solo o en combinación con otros componentes adecuados, puede prepararse en formulaciones de aerosol (es decir, puede "nebulizarse") para ser administrado por inhalación. Las formulaciones en aerosol se pueden colocar en propulsores presurizados aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

Las formulaciones adecuadas para administración rectal incluyen, por ejemplo, supositorios, que consisten en el ácido nucleico envasado con una base de supositorio. Las bases adecuadas para supositorios incluyen triglicéridos naturales o sintéticos o hidrocarburos parafínicos. Además, también es posible usar cápsulas rectales de gelatina que consisten en una combinación del compuesto de elección con una base, incluyendo, por ejemplo, triglicéridos líquidos, polietilenglicoles e hidrocarburos parafínicos.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral, tales como, por ejemplo, por vía intrarticular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal y subcutánea, incluyen soluciones inyectables estériles isotónicas, acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, disolventes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. En la práctica de esta invención, las composiciones se pueden administrar, por ejemplo, por infusión intravenosa, por vía oral, tópica, intraperitoneal, intravesical o intratecal. La administración parenteral, la administración oral, la administración subcutánea y la administración intravenosa son los métodos preferidos de administración. Un ejemplo específico de una formulación de solución adecuada puede comprender desde aproximadamente 0,5 a 100 mg/ml de compuesto y aproximadamente 1000 mg/ml de propilenglicol en agua. Otro ejemplo específico de una formulación en solución adecuada puede comprender desde aproximadamente 0,5 a 100 mg/ml de compuesto y desde aproximadamente 800 a 1000 mg/ml de polietilenglicol 400 (PEG 400) en agua.

Un ejemplo específico de una formulación de suspensión adecuado puede incluir de aproximadamente 0,5 a 30 mg/ml de compuesto y uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en: aproximadamente 200 mg/ml de etanol, aproximadamente 1000 mg/ml de aceite vegetal (p. ej., aceite de maíz), aproximadamente 600 a 1000 mg/ml de zumo de fruta (p. ej., zumo de pomelo), alrededor de 400 a 800 mg/ml de leche, aproximadamente

0,1 mg/ml de carboximetilcelulosa (o celulosa microcristalina), alrededor de 0,5 mg/ml de alcohol bencílico (o una combinación de alcohol bencílico y cloruro de benzalconio) y alrededor de 40 a 50 mM de tampón, pH 7 (p. ej., tampón fosfato, tampón acetato o tampón citrato o, alternativamente, se puede utilizar 5% de dextrosa en lugar del tampón) en agua.

- 5 Un ejemplo específico de una formulación de suspensión de liposomas adecuada puede comprender desde aproximadamente 0,5 a 30 mg/ml de compuesto, aproximadamente 100 a 200 mg/ml de lecitina (u otro fosfolípido o mezcla de fosfolípidos) y opcionalmente de aproximadamente 5 mg/ml de colesterol en agua. Para la administración subcutánea del compuesto 9, una formulación de suspensión de liposomas que incluye 5 mg/ml de compuesto en agua con 100 mg/ml de lecitina y 5 mg/ml de compuesto en agua con 100 mg/ml de lecitina y 5 mg/ml de colesterol
10 proporciona buenos resultados. Esta formulación puede utilizarse para otros compuestos de la invención.

Las formulaciones de compuestos pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitarias o de dosis múltiples, tales como ampollas y viales. Se pueden preparar soluciones y suspensiones inyectables a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito anteriormente.

- 15 La preparación farmacéutica está preferiblemente en forma de dosis unitaria. En dicha forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosis unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades discretas de la preparación, tales como comprimidos envasados, cápsulas y polvos en viales o ampollas. Además, la forma de dosificación unitaria puede ser la propia cápsula, comprimido, sello o pastilla, o puede ser el número apropiado de cualquiera de éstos en forma envasada. La composición puede, si se desea, también contener otros agentes terapéuticos compatibles, que se
20 analizan con más detalle a continuación.

También se da a conocer un método de preparación de una composición para el tratamiento y/o la inhibición de una enfermedad relacionada con el PSMA, comprendiendo el método mezclar un compuesto de la invención con un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 25 En la utilización terapéutica para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el PSMA, los compuestos utilizados en el método farmacéutico de la invención se administran a pacientes diagnosticados de enfermedades relacionadas con el PSMA a niveles de dosis adecuados para lograr un beneficio terapéutico. Por beneficio terapéutico se entiende que la administración del compuesto da lugar a un efecto beneficioso en el paciente con el tiempo. El beneficio terapéutico se consigue también si la administración del compuesto de ralentiza o se interrumpen completamente los síntomas adversos que acompañan por lo general a las enfermedades relacionadas con el PSMA.
30

Los compuestos de la invención y/o las composiciones de los mismos también se pueden administrar de manera profiláctica en pacientes que están en riesgo de desarrollar enfermedades relacionadas con el PSMA.

- 35 Las posologías iniciales adecuadas para la administración a seres humanos pueden determinarse a partir de ensayos *in vitro* o modelos animales. Por ejemplo, puede formularse una dosificación inicial para conseguir una concentración en el suero que incluye la CI_{50} del compuesto específico que se administra, medida en un ensayo *in vitro*. Alternativamente, una posología inicial para seres humanos puede basarse en posologías que se encuentra que son eficaces en modelos animales de enfermedades relacionadas con PSMA. Ejemplos de sistemas de modelos adecuados se describen, por ejemplo, en Muchmore, 2001, *Immunol. Rev.* 183:86-93 y Lanford y Bigger, 2002, *Virology*, 293:1-9, y lo referenciado citado en la presente memoria. Como ejemplo, la posología inicial puede estar comprendida en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg/día a aproximadamente 200 mg/kg/día, o
40 aproximadamente 0,1 mg/kg/día a aproximadamente 100 mg/kg/día, o aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 50 mg/kg/día, o aproximadamente 10 mg/kg/día a aproximadamente 50 mg/kg/día, también se puede utilizar. Las posologías, sin embargo, pueden variarse dependiendo de los requisitos del paciente, la gravedad de la afección que se está tratando, y el compuesto empleado. El tamaño de la dosis también se
45 determinará por la existencia, naturaleza, y extensión de cualesquiera efectos secundarios adversos que acompañan la administración de un compuesto determinado en un paciente determinado. La determinación de la posología apropiada para una situación determinada está dentro de la habilidad del médico. Generalmente, el tratamiento se inicia con dosis más pequeñas que son menores que la dosis óptima del compuesto. Después, la posología se aumenta en pequeños incrementos hasta alcanzar el efecto óptimo en circunstancias dadas. Por
50 conveniencia, la posología diaria total puede dividirse y administrarse en porciones durante el día, si se desea.

Definiciones

Todos los compuestos aquí se nombraron usando ACD/Name 8.00 (Product Release 8.17, Construido: 4 de mayo de 2005; <http://www.acdlabs.com>, Toronto, ON, Canadá)

- 55 Los compuestos de la presente invención pueden existir como estereoisómeros, en los que los centros asimétricos o quirales están presentes. La presente invención contempla diversos estereoisómeros y mezclas de los mismos y están específicamente incluidos dentro del alcance de esta invención. Los estereoisómeros incluyen enantiómeros, diastereómeros y mezclas de enantiómeros o diastereómeros.

5 El término "alquilo" tal como se utiliza en la presente memoria, significa un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que contiene de 1 a 24 átomos de carbono a menos que se defina de otra manera. Los ejemplos representativos de alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, 3-metilhexilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,3-dimetilpentilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo y n-decilo.

El término "alquil-arilo" tal como se utiliza en la presente memoria, significa un grupo arilo, tal como se define en este documento unido al radical de origen mediante un grupo alquilo, como se define en la presente memoria. Ejemplos de grupos alquil-arilo incluyen, pero no se limitan a bencilo y fenetilo.

10 El término "alquil-heteroarilo", como se utiliza en la presente memoria, significa un grupo heteroarilo, tal como se define en este documento unido al radical de origen mediante un grupo alquilo, como se define en la presente memoria. Ejemplos de grupos alquil-heteroarilo incluyen, pero no se limitan a piridilmetilo y 2-piridiletilo.

15 El término "arilo", como se utiliza en la presente memoria, significa fenilo o un arilo bicíclico o un arilo tricíclico. El arilo bicíclico es naftilo, o un fenilo fusionado a un cicloalquilo, o un fenilo fusionado a un cicloalqueno. El arilo bicíclico está unido al radical molecular de origen por cualquier átomo de carbono contenido dentro de la arilo bicíclico. Ejemplos representativos de arilo bicíclico incluyen, pero no se limitan a, dihidroindenilo, indenilo, naftilo, dihidronaftalenilo y tetrahidronaftalenilo. El arilo tricíclico es antraceno o fenantreno, o un arilo bicíclico fusionado a un cicloalquilo, o un arilo bicíclico fusionado a un cicloalqueno, o un arilo bicíclico fusionado a un fenilo. El arilo tricíclico está unido al resto molecular de origen por cualquier átomo de carbono contenido dentro del arilo tricíclico. Ejemplos representativos de anillo de arilo tricíclico incluyen, pero no se limitan a, azulenilo, dihidroantraceno, fluorenilo, y tetrahidrofenantrenilo.

25 El término "heteroarilo", como se utiliza en la presente memoria, significa un heteroarilo monocíclico o un heteroarilo bicíclico. El heteroarilo monocíclico es un anillo de 5 o 6 eslabones. El anillo de 5 eslabones consiste en dos enlaces dobles y uno, dos, tres o cuatro átomos de nitrógeno y opcionalmente un átomo de oxígeno o azufre. El anillo de 6 eslabones consiste en tres enlaces dobles y los átomos de una, dos, tres o cuatro de nitrógeno. El heteroarilo de 5 ó 6 eslabones está conectado a la fracción molecular principal mediante cualquier átomo de carbono o cualquier átomo de nitrógeno contenido dentro del heteroarilo. Los ejemplos representativos de heteroarilo monocíclico incluyen, pero no se limitan a, furilo, imidazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, oxazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, pirazolilo, pirrolilo, tetrazolilo, tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo, triazolilo y triazinilo. El heteroarilo bicíclico consiste en un heteroarilo monocíclico fusionado a un fenilo, o un heteroarilo monocíclico fusionado a un cicloalquilo, o un heteroarilo monocíclico fusionado a un cicloalqueno, o un heteroarilo monocíclico fusionado a un heteroarilo monocíclico. El heteroarilo bicíclico está conectado a la fracción molecular principal a través de cualquier átomo de carbono o cualquier átomo de nitrógeno contenido en el heteroarilo bicíclico. Los ejemplos representativos de heteroarilo bicíclico incluyen, pero no están limitados a, benzimidazolilo, benzofuranilo, benzotienilo, benzoxadiazolilo, cinolinilo, dihidroquinolinilo, dihidroisoquinolinilo, furopiridinilo, indazolilo, indolilo, isoquinolinilo, naftiridinilo, quinolinilo, tetrahidroquinolinilo y tienopiridinilo.

El término "halo" o "halógeno" tal como se utiliza en la presente memoria, significa -Cl, -Br, -I o -F.

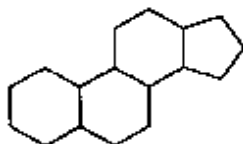
El término "hidroxi", como se utiliza en la presente memoria, significa un grupo -OH.

El término "metileno", como se utiliza en la presente memoria, significa un grupo -CH₂-.

El término "oxo" como se utiliza en la presente memoria, significa un resto =O.

40 El término "péptido", como se utiliza en la presente memoria, significa un péptido de dos a diez restos de aminoácidos.

El término "esteroide", como se utiliza en la presente memoria significa un monorradiado de un grupo con la estructura tetracíclica general,



45 en el que la estructura tetracíclica puede estar completamente saturada o contener 1 o más enlaces insaturados y puede estar unida al radical en cualquier posición sustituible disponible. Por ejemplo, una o más de las subunidades cíclicas puede ser aromática.

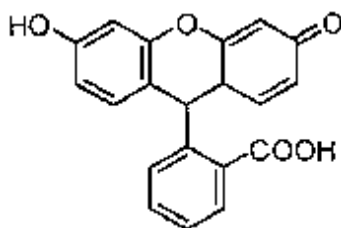
50 La expresión "análogo de glutamato", como se utiliza en la presente memoria, significa una estructura química planeada para imitar la estructura del ácido glutámico. Dicha estructura química se diseñaría en torno a la estructura molecular de ácido glutámico que consiste en un grupo amino o un bioisótero de un grupo amino y dos ácidos

5 carboxílicos o bioisómeros de ácidos carboxílicos en una posición similar uno con relación al otro como en la estructura del ácido glutámico. Por ejemplo, el grupo amino podía sustituirse con un grupo tiol, hidroxilo, hidroxilamino, oxima, o un grupo metileno. Uno o ambos de los ácidos carboxílicos se podían sustituir por un grupo carboxamida, fosfonato, fosfato, sulfonato o tetrazol. Un análogo de glutamato también consistiría en estructuras químicas tanto cíclicas como acíclicas, así como en estructuras homólogas (más cortas o más largas). Ejemplos de dichos análogos de glutamato que son biológicamente activos y se pueden utilizar en la presente invención se han examinado recientemente. *Aspartate and glutamate mimetic structures in biologically active compounds*. (Stefanic P., Dolenc M. S. *Curr Med Chem.* abril de 2004; 11 (8) :945-68), que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

10 La expresión "análogo de serina" como se usa en la presente memoria significa una estructura química planeada para imitar la estructura de la serina. Dicha estructura se diseñaría en torno a la estructura molecular de la serina que consiste en un grupo amino o un bioisómero de un grupo amino, un ácido carboxílico o bioisómero de ácido carboxílico, y un grupo hidroxilo o bioisómero de un grupo hidroxilo en una posición similar uno con relación al otro, como en la estructura de la propia serina. Por ejemplo, el grupo amino podría sustituirse por un grupo tiol, hidroxilo, o metileno. Los ácidos carboxílicos se podrían sustituir por un grupo carboxamida, fosfonato, fosfato, sulfonato o tetrazol. El ácido carboxílico podría eliminarse por completo. El grupo hidroxilo podría sustituirse por un grupo amino, tiol o metileno. Un análogo de serina también consistiría en estructuras químicas tanto cíclicas como acíclicas, así como de estructuras homólogas (más cortas o más largas).

20 La expresión "análogo de fosforamidato" como se utiliza en la presente memoria, significa una estructura química que imitaría la estructura molecular de un fosforamidato con capacidad de unirse al zinc. Por ejemplo, un análogo de fosforamidato podría ser un fosfonamidato, fosfonato, fosfato, fosfinato, sulfonamida, urea, N-hidroxiurea, tiourea, carbamato, hidroxamato, hidroxamato inverso, N-hidroxiamida o el grupo N-hidroxicarbamato.

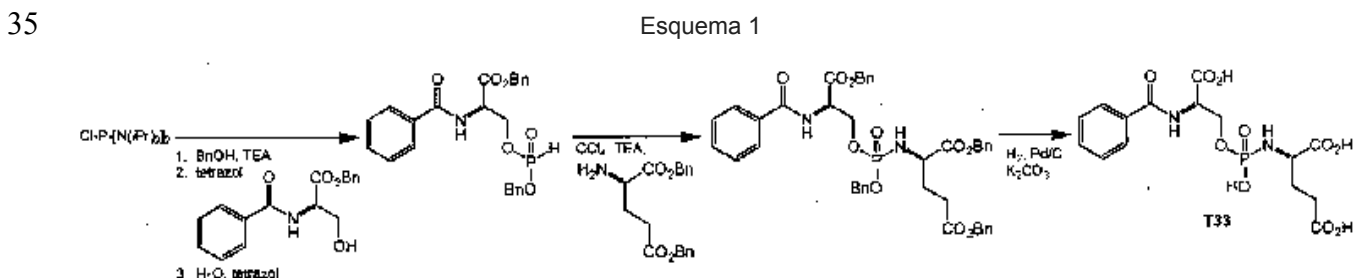
La expresión "una fluoresceína" se refiere a compuestos de la fórmula general,



25 La expresión "derivado de fluoresceína" se refiere a una fluoresceína como se define en la presente memoria, que está opcionalmente sustituida con uno a tres grupos que son independientemente halógeno o alquilo, cada uno como se define en la presente memoria.

Ejemplos

30 El esquema 1 presenta un esquema sintético representativo para la síntesis del inhibidor de fosforamidato **T33**. Utilizando esta estrategia general, más de 15 análogos de fosforamidato **T33** de complejidad variable se han sintetizado. Este esquema, en relación con las metodologías de síntesis convencionales, se puede utilizar para preparar compuestos según el primer aspecto de la invención. Los compuestos según el segundo aspecto de la invención pueden prepararse de manera rutinaria a partir del mismo utilizando metodologías de síntesis convencionales.



Ejemplo 1

Ensayo de inhibición del PSMA

40 Adaptado de, Maung, J.; Mallari, J.P.; Girtsman, T.A.; Wu, L.Y., Rowley, J.A.; Santiago, N.M.; Brunelle, A.; Berkman, C.E. Probing fórmula a Hydrophobic a Binding Register in Prostate-Specific Membrane Antigen with Phenylalkylphosphoramidates. *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12, 4969.

- Las soluciones de trabajo del sustrato ácido (N-[4-(fenilazo)benzoil]-glutamil-g-glutámico, PAB-Glu-γ-Glu) y todos los inhibidores se prepararon en tampón Tris (50 mM, pH 7,4). Las soluciones de trabajo de PSMA purificado se diluyeron apropiadamente en tampón Tris (50 mM, pH 7,4) para proporcionar de 15% a 20% de conversión de sustrato a producto en ausencia de inhibidor. Una mezcla de incubación típica (volumen final 250 μl) se preparó mediante la adición de 25 μl de una solución de inhibidor o 25 μl de tampón TRIS (50 mM, pH 7,4) a 175 μl de tampón TRIS (50 mM, pH 7,4) en un tubo de ensayo. Un volumen de 25 μl de PAB-Glu-γ-Glu (100 μM) se añadió a la solución anterior. La reacción enzimática se inició por la adición de 25 μl de la solución de trabajo PSMA. En todos los casos, la concentración final de PAB-Glu-γ-Glu fue 10 mM, mientras que la enzima se incubó con cinco concentraciones de inhibidor diluidas en serie para proporcionar una gama de inhibición de 10% a 90% de inhibición. La reacción se dejó proceder durante 15 min con agitación constante a 37°C y se terminó mediante la adición de 25 μl de TFA metanólico (2% de ácido trifluoroacético en volumen en metanol), seguido de agitación. La mezcla de incubación enfriada fue tamponada rápidamente por adición de 25 μl de K₂HPO₄ (0,1 M), se agitó y se centrifugó (10 min a 7000 g). Una alícuota de 85 μl del sobrenadante resultante se cuantificó posteriormente por HPLC. Se calcularon valores IC₅₀ utilizando KaleidaGraph 3,6 (Synergy Software).
- PABGγG y su producto de hidrólisis (PABG) se separaron y cuantificaron utilizando una columna analítica HPLC de fase inversa (Licrosphere C18 5 μm, 150 x 4,6 mm; Phenomenex, Torrence, CA) con una fase móvil consistente en ACN/fosfato de potasio [25 mM, pH 2,0 (ajustado con H₃PO₄)] en una relación en volumen respectiva de 40:60. A un caudal de 1,0 ml/min, PABGγG y su producto de hidrólisis (PABG) se detectaron a 325 nm con tiempos de retención de 4,8 y 6,9 min, respectivamente.

20 Ejemplo 2

Identificación de inhibidores potentes de PSMA mediante la poda molecular de análogos de fosforamidato de gamma-diglutamato

- Se diseñó y sintetizó el fosforamidato **T33** como un compuesto de plomo para la inhibición del PSMA. Su diseño se basa en las estructuras de los sustratos conocidos del PSMA tales como los derivados de gamma-glutamato de análogos de folato. La selección inicial de **T33** indicó que presentaba potencia considerable contra PSMA (CI₅₀ < 50 nM). Para comprender mejor la importancia de los diversos elementos estructurales de **T33** para la potencia inhibidora contra PSMA, se realizó un estudio de poda molecular en el que se creó una biblioteca de análogos de **T33** como se muestra en la figura 1. La síntesis de los tres compuestos de esta biblioteca se publicó previamente en la bibliografía: **CCS, JM139** (Lu, H.; Ng, R.; Shieh., C.C.; Martínez, A.R.; Berkman, C.E. Inhibition of Glutamate Carboxypeptidase by Phosphoryl and Thiophosphoryl Derivatives of Glutamic and 2-Hydroxyglutaric Acid. *Phosphorus, Sulfur and Silicon*, 2003, 178, 17), y **2-PMPA** (Jackson, P.F.; Cole, D.C.; Slusher, B.S.; Stetz, S.L.; Ross, L.E.; Donzanti, B.A.; Trainor, D.A., Design, synthesis, and biological activity of a patent inhibitor of the neuropeptidase N-acetylated-linked acidic dipeptidase. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 619-622.) Los compuestos restantes en la figura 1, la figura 2 y las figuras 7-12 son nuevos compuestos de la invención.
- Todos los compuestos de la biblioteca descritos en la figura 1, la figura 2 y las figuras 7-12 se seleccionaron para la potencia inhibidora de PSMA utilizando el ensayo descrito en el ejemplo 1.

- El cribado de la biblioteca en la figura 1 contra el PSMA purificado de células LNCaP por el método de los autores publicado (Purification of Prostate-Specific Membrane Antigen with Conformational Epitope-Specific Antibody-Affinity Chromatography. Liu, T.; Toriyabe, Y.; Berkman, CE. *Prot. Exp. Purif.* 2006, 49, 251.) indicaba que dos estructuras generales presentaban potencia inhibidora superior: peptidomiméticos intactos de fosforamidato tales como **T33** y **L36** así como análogos de *P1* sencillos tales como **CCS, JM140** y **2-PMPA**.

- A pesar de la falta de elementos de afinidad adicionales, se supone que el motivo fosforilo dibásico de **CCS, JM140** y **2-PMPA** es responsable de su aumento de afinidad para PSMA mediante fuertes interacciones con los átomos de zinc de la zona activa del PSMA. Curiosamente, se mantiene considerable afinidad en el análogo hidrófobo sencillo MP1D. La capacidad de PSMA para acomodar el ligando hidrófobo y espacialmente exigente se confirmó además cuando los autores prepararon y seleccionaron una biblioteca de inhibidores de fosforamidato que contienen esteroides (figura 2). Todos los compuestos en la figura 2 manifestaron una CI₅₀ inferior a 1 mM tal determinada por el ensayo descrito en el Ejemplo 1. Los resultados del ensayo de inhibición de MP1D y los inhibidores de fosforamidato que contienen esteroides están de acuerdo con el trabajo anterior de los autores en el que se identificó la existencia de un dominio hidrófobo de unión a distancia desde el sistema catalítico central del PSMA (Maung, J.; Mallari, J.P.; Girtsman, T.A.; Wu, L.Y.; Rowley, J.A.; Santiago, N.M.; Brunelle, A.; Berkman, CE. Probing for a Hydrophobic a Binding Register in Prostate-Specific Membrane Antigen with Phenylalkylphosphonamidates. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 4969.).

Ejemplo 3

- 55 Inhibición en función del tiempo e irreversible de PSMA por análogos de **T33**

Sorprendentemente, los autores han descubierto que los compuestos inhibidores del PSMA en la biblioteca del análogo **T33** (figura 1) no sólo eran potentes inhibidores del PSMA sino que presentaban una pérdida de actividad enzimática en función del tiempo como se muestra en la figura 3. Este resultado único ha llevado a los autores a

suponer que **T33** y sus análogos son únicos inhibidores de unión lenta. En algunos casos, la inhibición parece ser irreversible. Tal es el caso de **T33**, **L36** y **MP1E** ya que la actividad del PSMA no puede recuperarse por la dilución de 100 veces de la enzima inhibida por estos compuestos (figura 4). Estos resultados sugieren poderosamente que **T33**, **L36** y **MP1E** son ya sea inhibidores irreversibles de PSMA basados en el mecanismo o son inhibidores de PSMA funcionalmente irreversibles que conducen potencialmente a drásticos cambios de configuración y que ocasionan posiblemente alteración covalente a la enzima. Además de **T33**, **L36** y **MP1E**, recientemente los autores han demostrado que **LW-54** y **LW-39** son también inhibidores irreversibles de PSMA. Basándose en una revisión de la bibliografía, este es el primer descubrimiento de inhibidores dependientes del tiempo e irreversibles de PSMA. Mientras que la inhibición de unión lenta de las peptidasas y proteasas de zinc por derivados de ácido fosfórico es un fenómeno conocido, los inhibidores irreversibles basados en el mecanismo para dichas enzimas son poco frecuentes. Los inhibidores de la figura 1 se clasifican como inhibidores irreversibles y reversibles lentos en la figura 5. Todos los compuestos presentados en la figura 5 se manifestaban en CI_{50} inferior a 1 μ M.

Ejemplo 4

Formación de homodímero inducida por el inhibidor

Con respecto a la acción de los fosoramidatos **T33** y **L36**, los autores han demostrado que el tratamiento del PSMA con estos inhibidores dio como resultado la formación de homodímeros covalentes del PSMA indicada por inmunotransferencias Western. Como se muestra en el ejemplo representativo en la figura 6, la formación covalente del dímero PSMA mediada por **T33** tanto dependiente de la concentración como del tiempo. Estos resultados coinciden con la inhibición enzimática del PSMA en función del tiempo por el fosoramidato **T33** y sus análogos como se describió anteriormente. Más significativamente, estos datos están de acuerdo con los perfiles de inhibición irreversible de los compuestos **T33**, **L36** y **MP1D**. Estos datos sugieren que **T33** y **L36** están involucrados en modificaciones covalentes de PSMA que estimulan la reticulación entre proteínas y potencialmente la reticulación entre proteínas. Aunque los autores no han determinado el mecanismo de inhibición para **T33**, **L36** y **MP1D**, es evidente que estos agentes representan una clase única de inhibidores de PSMA que se puede utilizar como vehículos de suministro covalentes específicos para células cancerosas que expresan PSMA. Basándose en un examen superficial de la bibliografía, este es el primer diseño y preparación de modificadores covalentes irreversibles de PSMA.

Ejemplo 5

Especificidad de los inhibidores fosoramidato para PSMA

Para determinar que el diseño de los inhibidores de fosoramidato de la invención es específico para PSMA, se llevó a cabo un estudio preliminar con los compuestos representativos de la biblioteca del análogo T33 (figura 1) con metaloproteína-9 (MMP-9) de la matriz. Las enzimas MMP son endopeptidasas dependientes del cinc implicadas en la degradación de matrices extracelulares. De la serie de compuestos examinados incluyendo NC-2-29, sólo un compuesto (NC-2-29) mostró una potencia inhibitoria frente a MMP-9 con un valor de K_i de 5 mM. T33 se ha ensayado recientemente para la inhibición de MMP-2 y no demostró ninguna inhibición a concentraciones de hasta 10 mM. Estos resultados predominantemente negativos sugieren que el marco estructural general de los inhibidores a base de T33 de la invención confieren especificidad para la metalopeptidasa objetivo, PSMA.

Ejemplo 6

Marcaje dirigido por el inhibido de células de cáncer de próstata que expresan el PSMA

Recientes experimentos han demostrado que las cargas de diagnóstico por la imagen (tales como los fluoróforos orgánicos) pueden suministrarse específicamente a las células de cáncer de próstata que expresan PSMA. Se diseñó y sintetizó cuatro inhibidores de PSMA que cada uno posee un grupo amino del terminal N como un punto de unión para diagnóstico por la imagen o cargas terapéuticas (figura 8).

Estos compuestos se han modificado posteriormente con colorantes fluorescentes de amina reactiva (figura 9) para marcar específicamente células de cáncer de próstata que expresan PSMA. Basándose en los datos de microscopia de fluorescencia, cada uno de estos compuestos se ha demostrado que marcan específicamente células de cáncer de próstata que expresan PSMA (células LNCaP) y no marcan las células que no expresan PSMA (células PC3). El inhibidor fluorescente ligado a la tiourea **L6-V1-21** presentaba una CI_{50} de 85 nM contra PSMA. Este resultado demuestra que la potencia inhibitoria no se suprimía cuando el núcleo inhibitor se modificaba con un motivo estructural de tamaño considerable. Las células de cáncer de próstata que expresan PSMA (LNCaP) tratadas con **L6-VI-21** producían un marcaje específico como se observa por microscopia de fluorescencia. La microscopia confocal se llevó a cabo tanto en las células LNCaP como PC3 de cáncer de próstata después del tratamiento con de L6-V1-21 y yoduro de propidio.

Cuando las células LNCaP se tratan con **L6-V1-21**, la microscopia de fluorescencia confirma el marcaje extenso de la superficie celular por **L6-V1-21**, mostrado por marcaje fluorescente verde intenso de las células. Cuando las células LNCaP se tratan con **L6-V1-2** y yoduro de propidio, la microscopia de fluorescencia confocal confirma marcaje extenso de la superficie celular por **L6-V1-21**, como se muestra por el marcaje fluorescente verde intenso

5 en la superficie de las células mientras que se observó fluorescencia roja para la núcleos de células procedente de la tinción de yoduro de propidio. Cuando las células PC3 se tratan con **L6-V1-2** y yoduro de propidio, la microscopia de fluorescencia confocal confirma la especificidad de **L6-V1-2** por las células que expresan PSMA (LNCaP) como sin marcaje fluorescente verde en la superficie de las células se observa para las células PC3 pero se observa fluorescencia roja para los núcleos de células de la tinción con yoduro de propidio. Las células PC3 sirvieron como referencia negativa porque no expresan PSMA. Si bien el yoduro de propidio tiñó los núcleos de ambas estirpes celulares, sólo la superficie de las células LNCaP que expresan PSMA se marcaron con fluorescencia con **L6-V1-21**. Los sitios marcados intensamente en estas células LNCaP se supone que son posiciones en las que se ha agregado PSMA.

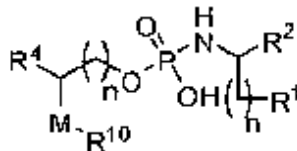
10 Se demostró por microscopia de fluorescencia de las células LNCaP tratadas con el inhibidor fluorescente **LW-54-F5EX** que los inhibidores de molécula pequeña de PSMA son sustancialmente equivalentes a un anticuerpo (3C6) en el suministro y marcaje de células que expresan PSMA con un colorante fluorescente. En ese experimento, tanto **LW-54** como el anticuerpo 3C6 marcado cada uno con fluoresceína-5-EX marcaba específicamente las membranas de las células LNCaP. Cuando las células LNCaP se trataron con **LW-54-F5EX** o el anticuerpo marcado con fluorescencia **3C6-F5EX**, la microscopia de fluorescencia confirma extenso marcaje de la superficie celular en ambos casos como se pone de manifiesto por el marcaje fluorescente verde intenso de las superficies celulares. Para confirmar que **LW-54-F5EX** era específico para las células que expresan PSMA, tanto en células LNCaP como las PC3 se trataron con este compuesto. Mientras DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) teñía el ADN nuclear en ambas estirpes celulares, sólo las células LNCaP se marcaban fluorescentemente con LW-54-F5EX. Cuando las células LNCaP se tratan con **LW-54-F5EX** y DAPI, la microscopia de fluorescencia confirma extenso marcaje de la superficie celular por **LW-54-F5EX** como se muestra por el marcaje fluorescente verde intenso en la superficie de las células mientras que la fluorescencia azul se observa en los núcleos celulares procedente de la tinción con DAPI. Cuando las células PC3 se tratan con **LW-54-F5EX** y DAPI, la microscopia de fluorescencia confirma el marcaje extenso de la superficie celular por **LW-54-F5EX** como se muestra por el marcaje fluorescente verde intenso en la superficie de las células mientras que se observa fluorescencia azul para los núcleos de las células procedente de la tinción con DAPI. Debido a que las células PC3 no expresan PSMA, estos resultados confirman que los agentes de pequeña molécula tales como 54-F5EX son específicos para las células cancerosas que expresan PSMA.

30 La microscopia de fluorescencia de las células LNCaP tratadas con el inhibidor fluorescente **LW-54-5FAMX** volvió a demostrar que los inhibidores de molécula pequeña de PSMA son sustancialmente equivalentes a los anticuerpos en el suministro y el marcaje de las células que expresan PSMA con un colorante fluorescente. En ese experimento, tanto células LNCaP como las PC3 se trataron con **LW-54-5FAMX**. Mientras DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) tiñó ADN nuclear en ambas estirpes celulares, sólo las células LNCaP se marcaron por fluorescencia con **LW-54-5FAMX**. Cuando las células LNCaP se tratan con **LW-54-5FAMX** y DAPI, microscopia de fluorescencia confirma el marcaje de la superficie celular extenso por **LW-54-5FAMX** como se muestra por marcaje fluorescente verde intenso en la superficie de las células mientras se observa fluorescencia azul para los núcleos celulares en la tinción con DAPI. Cuando las células PC3 se tratan con **LW-54-5FAMX** y DAPI, la microscopia de fluorescencia confirma la especificidad de **LW-54-5FAMX** para las células que expresan PSMA (LNCaP) ya que no se observa ningún marcaje fluorescente verde en la superficie de las células para las células PC3 pero se observa fluorescencia azul de los núcleos de células en la tinción con DAPI. Estos resultados confirman que los agentes de molécula pequeña tales como **LW-54-5FAMX** son específicos para las células cancerosas que expresan PSMA.

45 Los resultados anteriores de los estudios de marcaje de células confirman que el marcaje específico para LNCaP se puede lograr por los inhibidores de PSMA no biológicos, de molécula pequeña. Estos resultados sirven como prueba de que los inhibidores de moléculas pequeñas de PSMA específicamente puede suministrar cargas para diagnóstico por la imagen o terapéuticas a las células cancerosas que expresan PSMA.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de fórmula



en la que

5 cada n es independientemente 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

cada R¹ y R² son independientemente -C(O)OR³, -C(O)N(R³)₂, -P(O)(OR³)₂, -OP(O)(OR³)₂, -S(O)₂R³, -S(O)₂OR³, -S(O)₂N(R³)₂ o tetrazolilo;

cada R³ es independientemente -H o alquilo C₁-C₆;

R⁴ es -H, -C(O)OR³, -C(O)N(R³)₂, -P(O)(OR³)₂, -OP(O)(OR³)₂, -S(O)₂R³, -S(O)₂OR³, -S(O)₂N(R³)₂, o tetrazolilo;

10 M es -O-, -S-, -N(R³)- o -CH₂-;

R¹⁰ es -H, alquilo C₁-C₆, -aril-arilo, -XR⁶, -R⁷, -C(O)R⁵, -S(O)₂R⁵, un péptido que tiene dos a diez restos de aminoácidos, un dendrímero o un dendrímero peptídico en el que

X es -O-, -S- o -N(R³)-;

R⁵ es -CH(R⁵¹)N(R⁵²)₂;

15 alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con 1 a 3 grupos que son independientemente -halógeno, COOR⁵³, -N(R⁵²)₂;

o heteroarilo, en el que

20 R⁵¹ es -H, heteroarilo, alquil-arilo C₁-C₆ sustituido con -OH; alquil-heteroarilo C₁-C₆, o alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con -OR⁵³, -SR⁵³, -NH₂, -N(H)C(=NH)NH₂, -COOR⁵³ o -C(O)N(R⁵³)₂; y

R⁵² es -H, alquilo C₁-C₆, -C(O)R⁵³, C(O)OR⁵³, -C(O)NH(alquilo C₁-C₆), -C(O)N(R⁵³)₂, o -C(O)heteroarilo;

R⁵³ es -H o alquilo C₁-C₆;

R⁶ es -H o alquilo C₁-C₆;

25 y

R⁷ es -L¹-R⁸, en el que

L¹ es -C(O)N(R³)-, -C(S)N(R³)-, -C(O)CH(R²¹)-, -C(O)(O) o -C(O)-L²-, en la que

R²¹ es -H, heteroarilo, alquilo-arilo C₁-C₆ sustituido con -OH; alquil-heteroarilo C₁-C₆, o alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con -OR²³, -SR²³, -NH₂, -N(H)C(=NH)NH₂, -COOR²³ o -C(O)N(R²³)₂; y

30 R²³ es -H o alquilo C₁-C₆;

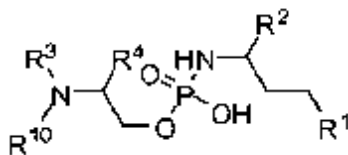
L² es -alquilo C₁-C₂₄- o -fenil-alquilo C₁-C₂₄-, en el que

cada grupo alquilo está opcionalmente sustituido con 1 a 4 grupos que son oxo, =S o -COOH; y

35 uno a seis de los grupos metileno en cada grupo alquilo está opcionalmente sustituido por -O-, -S- o -N(R³)-, a condición de que ninguno de los dos grupos metileno adyacentes estén sustituidos por -O-, -S-, o -N(R³)-; y

R⁸ es -H, -NH₂ u -OH.

2. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de la reivindicación 1 de fórmula,



3. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de la reivindicación 2, en el que cada R¹ y R² es -C(O)OH.

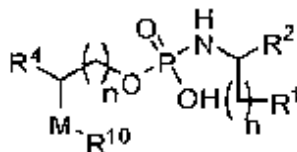
5 4. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de la reivindicación 2, en el que R¹⁰ es R⁷.

5. El compuesto de la reivindicación 1 que es

ácido *N*-{[(2*S*)-2-{[4-(aminometil)benzoil]amino}-2-carboxietoxi](hidroxi)fosforil}-L-glutámico; L- γ -glutamyl-O-[[[(1*S*)-1,3-dicarboxipropil]amino](hidroxi)fosforil]-L-serina; ácido *N*-{[(2*S*)-2-amino-2-carboxietoxi](hidroxi)fosforil}-L-glutámico; ácido *N*-{[(2*S*)-20-amino-2-carboxi-4,8-dioxo-6,12,15,18-tetraoxa-3,9-diazoicos-1-il]oxi}(hidroxi)fosforil]-L-glutámico;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

6. Un compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptable de fórmula



en la que

cada n es independientemente 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

10 cada R¹ y R² son independientemente -C(O)OR³, -C(O)N(R³)₂, -P(O)(OR³)₂, -OP(O)(OR³)₂, -S(O)₂R³, -S(O)₂OR³, -S(O)₂N(R³)₂ o tetrazolilo;

cada R³ es independientemente -H o alquilo C₁-C₆;

R⁴ es -H, -C(O)OR³, -C(O)N(R³)₂, -P(O)(OR³)₂, -OP(O)(OR³)₂, -S(O)₂R³, -S(O)₂OR³, -S(O)₂N(R³)₂, o tetrazolilo;

M es -O-, -S-, -N(R³)- o -CH₂-;

15 R¹⁰ es -H, alquilo C₁-C₆, arilo, alquil C₁-C₆-arilo, -aril-arilo, -XR⁶, -R⁷, -C(O)R⁵, -S(O)₂R⁵, un péptido que tiene dos a diez restos de aminoácidos, un dendrímero o un dendrímero peptídico en el que

X es -O-, -S- o -N(R³)-;

R⁵ es -CH(R⁵¹)N(R⁵²)₂;

20 alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con 1 a 3 grupos que son independientemente -halógeno, COOR⁵³, -N(R⁵²)₂;

arilo;

o heteroarilo, en el que

25 R⁵¹ es -H, arilo, heteroarilo, alquil-arilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con -OH; alquil-heteroarilo C₁-C₆, o alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con -OR⁵³, -SR⁵³, -NH₂, -N(H)C(=NH)NH₂, -COOR⁵³ o -C(O)N(R⁵³)₂; y

R⁵² es -H, alquilo C₁-C₆, -C(O)R⁵³, C(O)OR⁵³, -C(O)NH(alquilo C₁-C₆), -C(O)N(R⁵³)₂, -C(O)arilo o C(O)heteroarilo;

R⁵³ es -H, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆-arilo;

R⁶ es -H o alquilo C₁-C₆;

y

R⁷ es -L¹-R⁸, en el que

L¹ es -C(O)N(R³)-, -C(S)N(R³)-, -C(O)CH(R²¹)-, -C(O)(O) o -C(O)-L²-, en la que

5 R²¹ es -H, arilo, heteroarilo, alquilo C₁-C₆-arilo opcionalmente sustituido con -OH; alquilo C₁-C₆-heteroarilo, o alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con -OR²³, -SR²³, -NH₂, -N(H)C(=NH)NH₂, -COOR²³ o -C(O)N(R²³)₂; y

R²³ es -H o alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆-arilo;

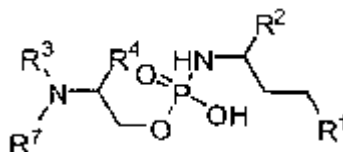
L² es -alquilo C₁-C₂₄- o -fenil-alquilo C₁-C₂₄-, en el que

10 cada grupo alquilo está opcionalmente sustituido con 1 a 4 grupos que son oxo, =S o -COOH; y uno a seis de los grupos metileno en cada grupo alquilo está opcionalmente sustituido por -O-, -S- o -N(R³)-, a condición de que ninguno de los dos grupos metileno adyacentes estén sustituidos por -O-, -S-, o -N(R³)-; y

R⁸ es -H, -NH₂ u -OH,

15 en el que el compuesto está unido por enlace covalente mediante un enlazador divalente a un marcador detectable, agente terapéutico o anclaje biomolecular unido a un soporte sólido en cualquier posición sustituible del compuesto.

7. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de la reivindicación 6, de fórmula,



en la que

cada n es independientemente 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

20 cada R¹ y R² son independientemente -C(O)OR³, -C(O)N(R³)₂, -P(O)(OR³)₂, -OP(O)(OR³)₂, -S(O)₂R³, -S(O)₂OR³, -S(O)₂N(R³)₂ o tetrazolilo;

cada R³ es independientemente -H o alquilo C₁-C₆;

R⁴ es -H, -C(O)OR³, -C(O)N(R³)₂, -P(O)(OR³)₂, -OP(O)(OR³)₂, -S(O)₂R³, -S(O)₂OR³, -S(O)₂N(R³)₂, o tetrazolilo;

R⁷ es -XR⁸ o -L¹-R⁸, en las que

25 X es -O-, -S- o -N(R³)-;

L¹ es -C(O)N(R³)-, -C(S)N(R³)-, -C(O)CH(R²¹)-, -C(O)(O)-, -C(O)L²-, un péptido que tiene dos a diez restos de aminoácido, un dendrímero o un dendrímero peptídico, en las que

30 R²¹ es -H, arilo, heteroarilo, alquil C₁-C₆-arilo opcionalmente sustituido con -OH; alquil C₁-C₆-heteroarilo, o alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con -OR²³, -SR²³, -NH₂, -N(H)C(=NH)NH₂, -COOR²³ o -C(O)N(R²³)₂; y

R²³ es -H, alquilo C₁-C₆ o alquilo C₁-C₆-arilo;

L² es -alquilo C₁-C₂₄- o -fenil-alquil C₁-C₂₄-, en las que

cada grupo alquilo está opcionalmente sustituido con 1 a 4 grupos que son oxo, =S o -COOH; y

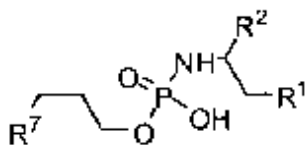
35 uno a seis de los grupos metileno en cada grupo alquilo está opcionalmente sustituido por -O-, -S- o -N(R³)-, a condición de que ninguno de los dos grupos metileno adyacentes estén sustituidos por -O-, -S-, o -N(R³)-; y

R⁸ es un anclaje biomolecular unido a un soporte sólido, agente terapéutico o marcador detectable.

8. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de la reivindicación 7, en el que R⁸ es un agente terapéutico.

5 9. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de la reivindicación 8, en el que R⁸ es un grupo esteroideo opcionalmente sustituido con 1 a 5 grupos seleccionados del grupo consistente en alquilo C₁-C₁₀, oxo, hidroxilo o halógeno.

10. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de la reivindicación 7, de fórmula,



en la que

R⁷ es -O-R⁸, en el que

10 R⁸ es un grupo esteroideo opcionalmente sustituido con 1 a 5 grupos seleccionados del grupo que consiste en alquilo C₁-C₁₀, oxo, hidroxilo, o halógeno.

11. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de la reivindicación 7, en el que R⁸ es un marcador detectable.

12. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de la reivindicación 11, en el que R⁸ es un marcador fluorescente.

15 13. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de la reivindicación 12, en el que R⁸ es una fluoresceína o un derivado de fluoresceína.

14. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de la reivindicación 7, en el que R⁸ es un agente quelante.

15. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de la reivindicación 14, en el que

20 R⁸ es R⁹, en el que

R⁹ es alquilo C₁-C₆, arilo o alquil C₁-C₆-arilo, en el que R⁹ está sustituido con uno a tres grupos que son independientemente -COOH o N(R⁹¹)₂, en el que

cada R⁹¹ es independientemente -H o alquilo C₁-C₆ sustituido con 1 a 3 grupos que son independientemente -COOH o -N(R⁹²)₂ en el que

25 cada R⁹² es independientemente -H o alquilo C₁-C₆ sustituido con 1 a 3 COOH.

16. El compuesto según la reivindicación 7 que es

ácido *N*-{[2*S*]-2-carboxi-2-[(4-[[3-[(2-[[3-carboxi-4-(6-hidroxi-3-oxo-9,9a-dihidro-3*H*-xanten-9-il)fenil]amino]-2-oxoetil]tio]propanoil]amino)metil]benzoil]amino)etoxi](hidroxil)fosforil]-L-glutámico;

ácido *N*-{[(2*S*)-2-carboxi-2-[(4-[[6-[[3-carboxi-4-(6-hidroxi-3-oxo-9,9a-dihidro-3*H*-xanten-9-il)benzoil]amino]-hexanoil]amino)metil]benzoil]amino]etoxi](hidroxil)fosforil]-L-glutámico

30 *N*-{3-[(2-[[3-carboxi-4-(6-hidroxi-3-oxo-9,9a-dihidro-3*H*-xanten-9-il)fenil]amino]-2-oxoetil]tio]propanoil]-L-γ-glutamil-O-[[[(1*S*)-1,3-dicarboxipropil]amino](hidroxil)fosforil]-L-serina;

N-(6-[[3-carboxi-4-(6-hidroxi-3-oxo-9,9a-dihidro-3*H*-xanten-9-il)benzoil]amino]hexanoil)-L-γ-glutamil-O-[[[(1*S*)-1,3-dicarboxipropil]amino](hidroxil)fosforil]-L-serina;

ácido *N*-{[(2*S*)-2-carboxi-2-[[3-[(2-[[3-carboxi-4-(6-hidroxi-3-oxo-9,9a-dihidro-3*H*-xanten-9-il)fenil]amino]carbonotioil]amino)etoxi](hidroxil)fosforil]-L-glutámico;

35 *N*-{[(4-[[2-[[bis(carboximetil)amino]-3-[[2-[[bis(carboximetil)amino]etil](carboximetil)amino]propil]fenil]amino]carbonotioil]-L-γ-glutamil-O-[[[(1*S*)-1,3-dicarboxipropil]amino](hidroxil)fosforil]-L-serina;

N-{6-[(6-[[5-(2-oxohexahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-4-il)pentanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil)-L-γ-glutamil-O-[[[(1*S*)-1,3-dicarboxipropil]amino](hidroxil)fosforil]-L-serina;

ácido N -{[(2S)-2-carboxi-2-({4-[(6-[(5-(2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanoil]amino)hexanoil]amino)hexanoil]amino)metil]benzoil]amino)etoxi}(hidroxi)fosforil]-L-glutámico;

ácido N -{[3-[(3 β ,8 ξ ,9 ξ ,14 ξ ,17 ξ ,20 ξ)-colestán-3-iloxi]propoxi}(hidroxi)fosforil]-L-glutámico;

ácido N -(hidroxi(3-[(3 β ,8 ξ ,9 ξ ,14 ξ)-17-oxoandrostan-3-il]oxi)propoxi)fosforil]-L-glutámico;

ácido N -(hidroxi(3-[(17-oxoestra-1(10),2,4-trien-3-il]oxi)propoxi)fosforil]-L-glutámico;

ácido N -{[3-[(3-(benzoiloxi)estra-1(10),2,4-trien-17-il]oxi)propoxi}(hidroxi)fosforil]-L-glutámico

o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

5 17. El compuesto de la reivindicación 1 que es L- γ -glutamil-O-[[[(1S)-1,3-dicarboxipropil]amino}(hidroxi)fosforil]-L-serina o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

18. El compuesto de la reivindicación 6 que es L- γ -glutamil-O-[[[(1S)-1,3-dicarboxipropil]amino}(hidroxi)fosforil]-L-serina, unido por enlace covalente mediante un enlazador divalente a un marcador detectable, agente terapéutico, o anclaje biomolecular unido a un soporte sólido en cualquier posición sustituible del compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

10 19. El compuesto de la reivindicación 18 que es L- γ -glutamil-O-[[[(1S)-1,3-dicarboxipropil]amino}(hidroxi)fosforil]-L-serina, unido por enlace covalente mediante un enlazador divalente a un marcador detectable, en cualquier posición sustituible del compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

20. El compuesto de la reivindicación 1, en el que

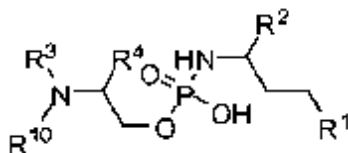
L^2 es -alquilo C_{1-24} -, en la que

15 el grupo alquilo está opcionalmente sustituido con 1 a 4 grupos que son oxo, =S o -COOH; y uno a seis de los grupos metileno en cada grupo alquilo está opcionalmente sustituido por -O-, -S- o -N(R³)-, a condición de que ninguno de los dos grupos metileno adyacentes estén sustituidos por -O-, -S- o -N(R³)-.

21. El compuesto de la reivindicación 7, en el que L^1 es -C(O)L²-.

22. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de la reivindicación 6 de fórmula,

20



23. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de la reivindicación 7, en el que cada R^1 y R^2 es -C(O)OH.

24. El compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables de la reivindicación 7, en el que R^{10} es R^7 .

25. El compuesto según la reivindicación 6 que es

ácido N -{[(2S)-2-([4-(aminometil)benzoil]amino)-2-carboxietoxi}(hidroxi)fosforil]-L-glutámico;

L- γ -glutamil-O-[[[(1S)-1,3-dicarboxipropil]amino}(hidroxi)fosforil]-L-serina;

ácido N -{[(2S)-2-amino-2-carboxietoxi}(hidroxi)fosforil]-L-glutámico;

ácido N -{[(2S)-20-amino-2-carboxi-4,8-dioxo-6,12,15,18-tetraoxa-3,9-diazoicos-1-il]oxi}(hidroxi)fosforil]-L-glutámico;

25 o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

26. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 7, 11, 18, 19 y 21 a 25 en el que el marcador detectable es una estructura quelante de radioisótopo.

27. El compuesto de la reivindicación 6, en el que el enlazador divalente es un aminoácido, oligopéptido, poli(etilen)glicol o un oligoetilenglicol.

28. El compuesto de la reivindicación 6 que es *N*-{[(4-{2-[bis(carboximetil)amino]-3-[[2-[bis(carboximetil)amino]etil](carboximetil)amino]propil]fenil)amino]carbonotioil)-L-γ-glutamil-O-[[[(1S)-1,3-dicarboxipropil]amino](hidroxi)fosforil]-L-serina o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.
- 5 29. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 6 – 7, 11, 14 – 15, 18 – 19 y 21 – 25 en el que el marcador detectable es una estructura quelante unida a un radioisótopo o un agente de contraste de diagnóstico por la imagen por resonancia magnética.
30. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 7, 8, 18 y 21 – 25 en el que el agente terapéutico comprende un radioisótopo citotóxico quelado o unido por enlace covalente.
31. El compuesto de la reivindicación 30, en el que el radioisótopo citotóxico es ^{90}Y o ^{188}Re .
- 10 32. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 7, 8, 18 y 21 – 25 en el que el agente terapéutico es un agente anticanceroso, antiproliferante o citotóxico; un agente que estimula o aumenta la inmunogenicidad de las células; un inductor de apoptosis; inhibidores de histona desacetilasa; un inductor de apoptosis o ARNsi citotóxico; un agente antimitótico; o nanopartículas o liposomas que encapsulan un fármaco citotóxico.
- 15 33. El compuesto de la reivindicación 32, en el que el agente terapéutico es 2-metoxiestradiol, mifepristona, tamoxifeno, ácido retinoico, butirato, PIK1 ARNsi, doxorubicina o metotrexato.
34. Una composición que comprende un compuesto según cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 33 y un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
35. Un kit de diagnóstico que comprende un compuesto de cualesquiera de las reivindicaciones 6 a 16 y 18 a 33.
- 20 36. Un compuesto, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, según cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 33 para su utilización en medicina.
37. Un método *in vitro* para detectar células presentadoras del antígeno membranario específico de la próstata, que comprende poner en contacto células con un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, 11 a 15, 17 a 19 y 21 a 29 y detectar el marcador detectable en condiciones que permiten la detección de las células presentadoras del PSMA únicamente.
- 25 38. Utilización de un compuesto, o de una de sus sales farmacéuticas, según cualesquiera de las reivindicaciones 1 a 33 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad relacionada con el PSMA o en la preparación de una composición para la detección de células presentadoras del PSMA.
- 30 39. Un compuesto, o una de sus sales farmacéuticas, según cualesquier de las reivindicaciones 1 a 33 para su utilización en el tratamiento de una enfermedad relacionada con el PSMA o en la preparación de una composición para la detección de células presentadoras del PSMA.
40. Un método *in vitro* para capturar, detectar y cuantificar células presentadoras del antígeno membranario específico de la próstata (PSMA) que comprende poner en contacto células sospechosas de presentar el PSMA con un compuesto según cualesquiera de las reivindicaciones 6 a 7, 11 a 15, 17 a 19 y 21 a 29; y detectar la presencia de células presentadoras del PSMA capturadas o inmovilizadas.
- 35 41. Una ampolla o vial que contiene un compuesto según cualesquiera de las reivindicaciones 6 a 16 y 18 a 33 y una solución inyectable estéril, isotónica, acuosa o no acuosa.

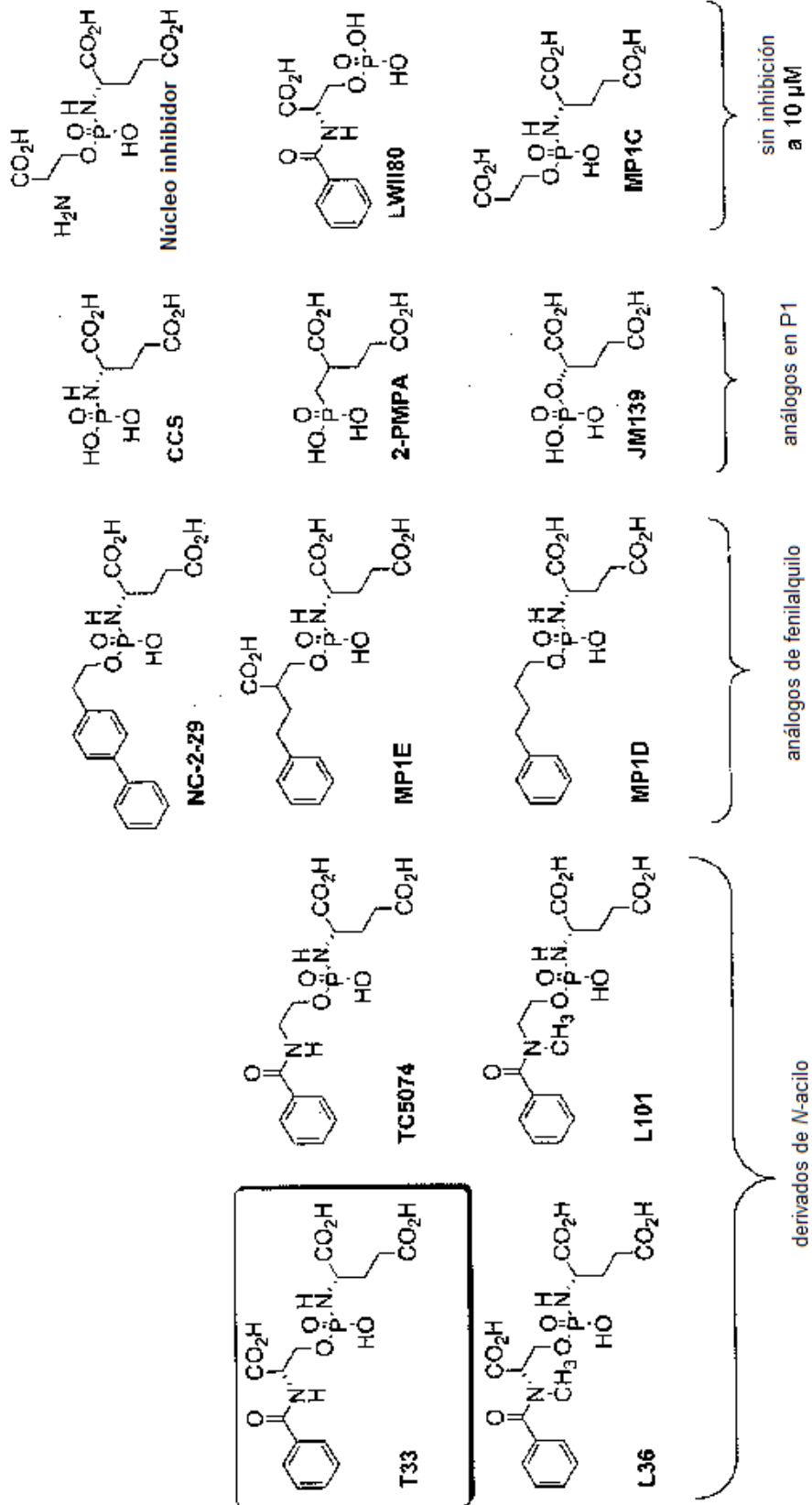


Figura 1

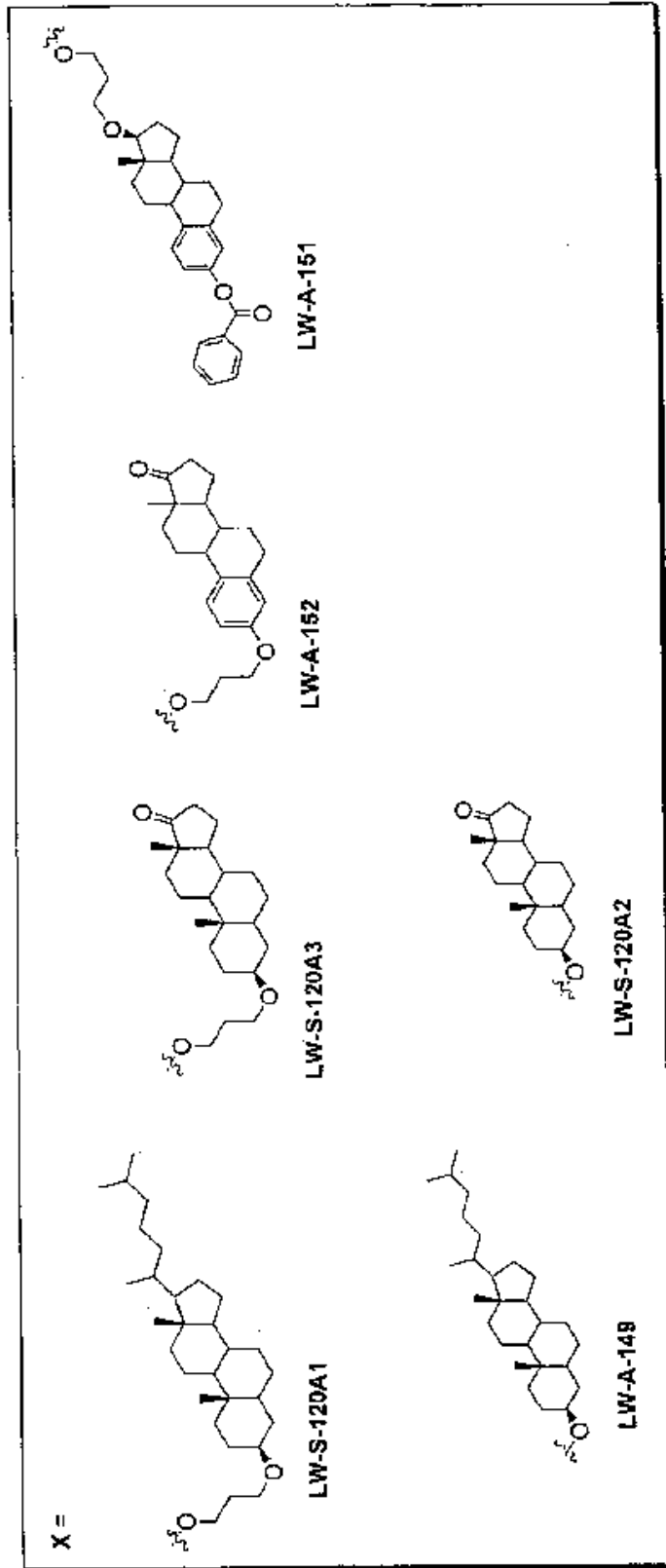
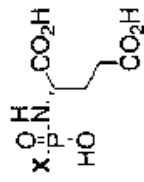


Figura 2

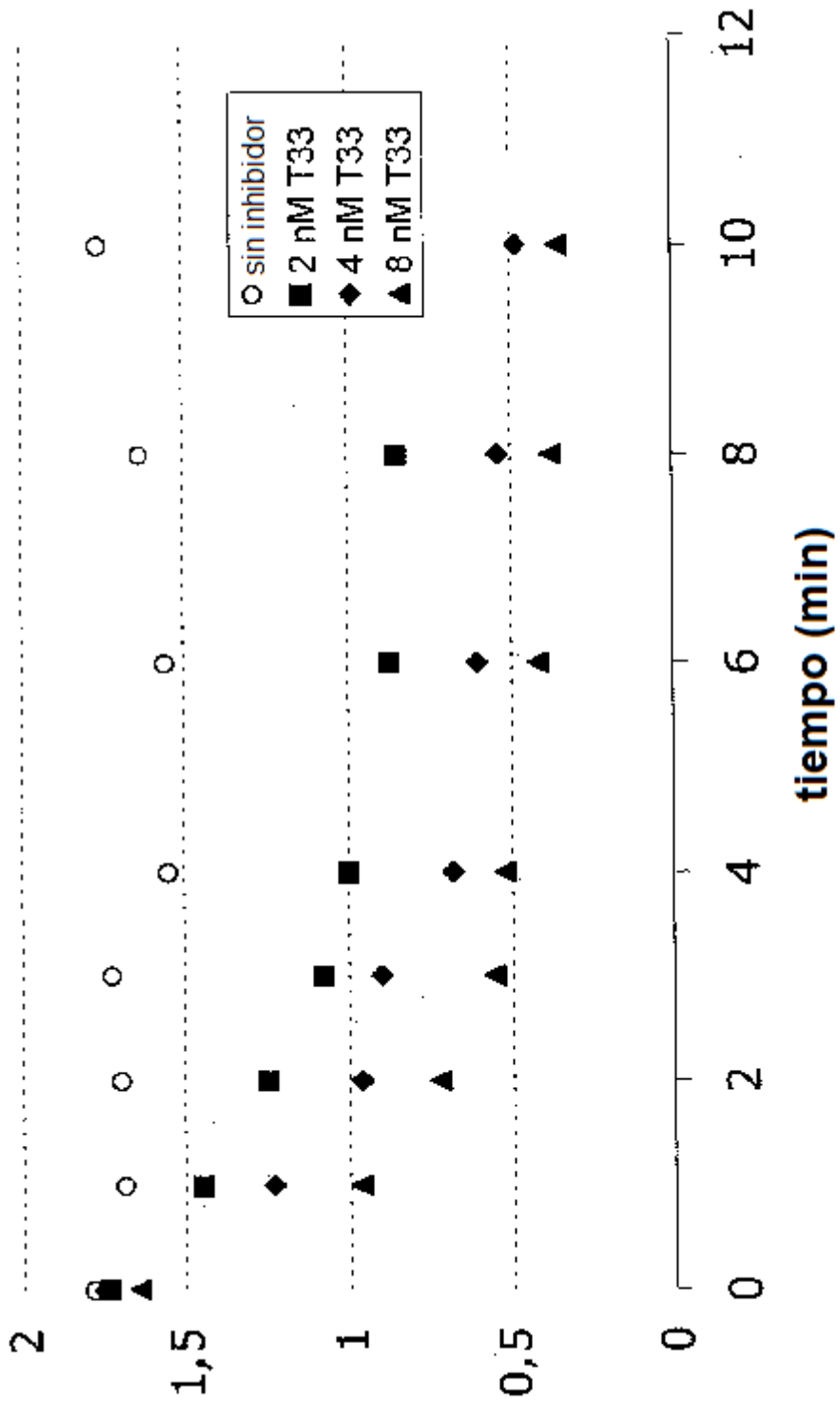


Figura 3

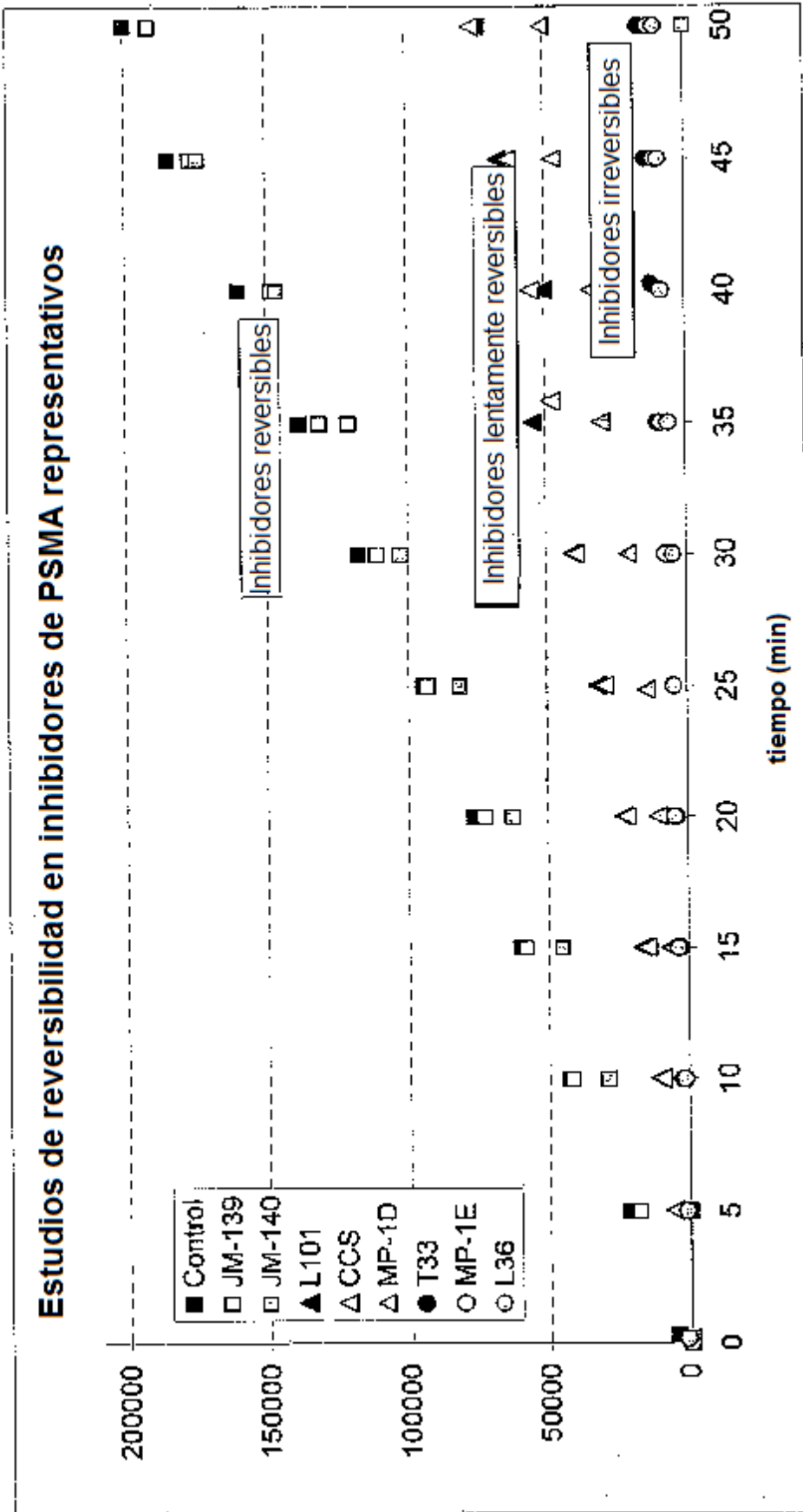


Figura 4

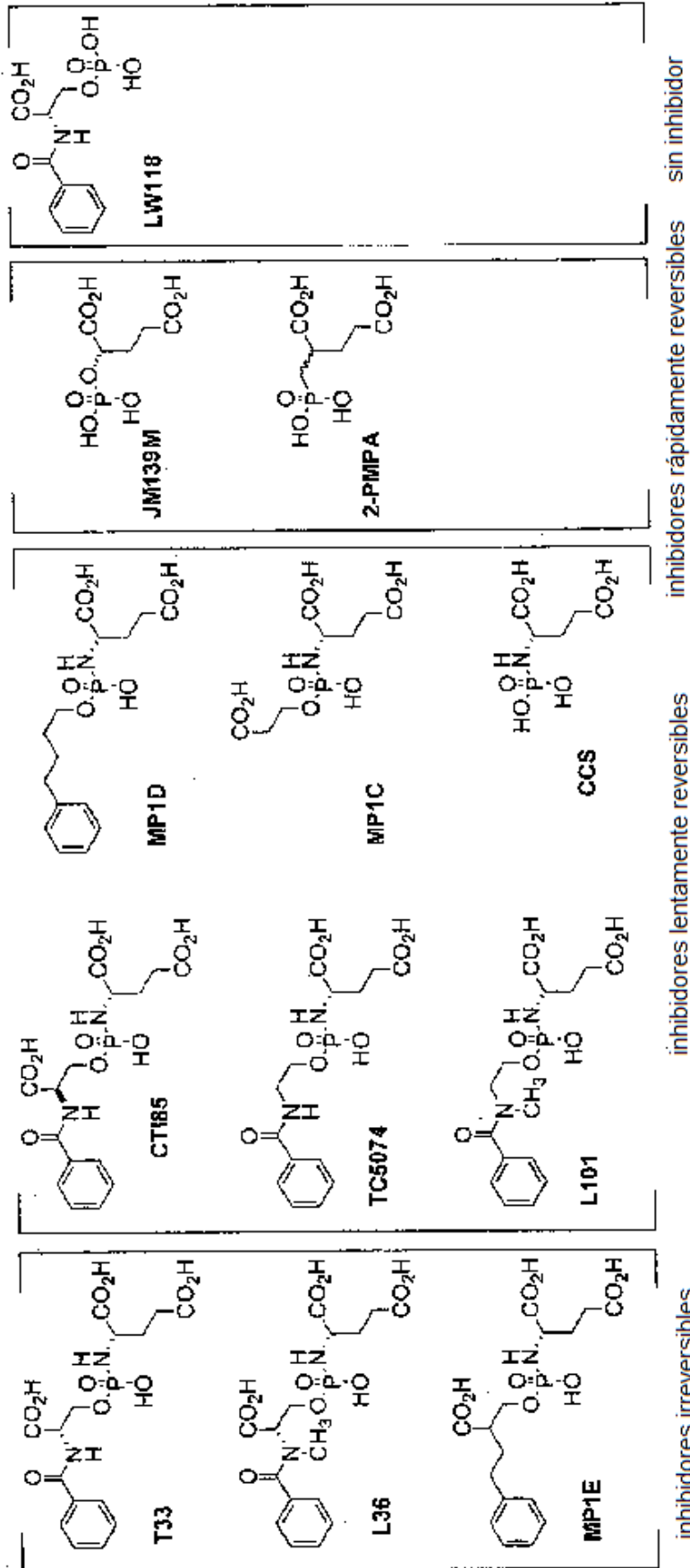
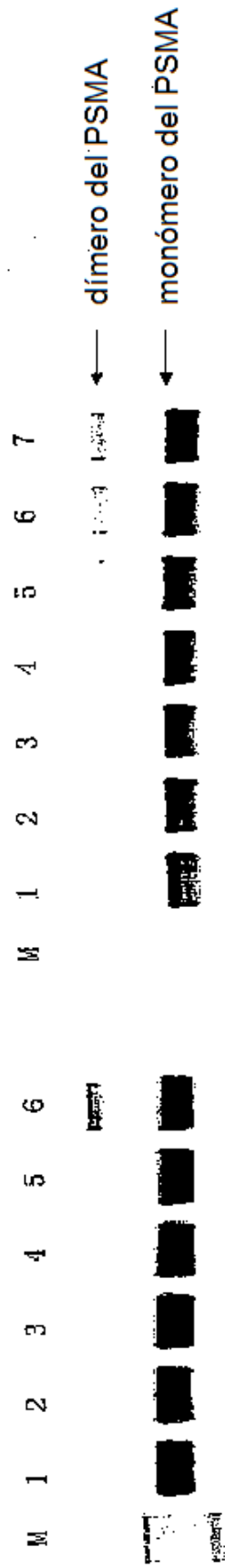


Figura 5



B

A

Figura 6

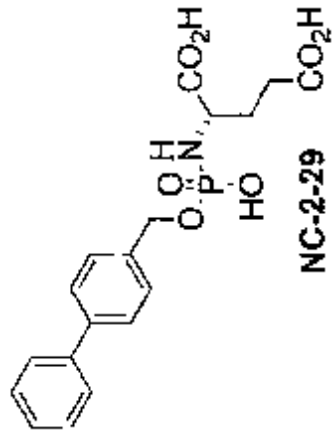


Figure 7

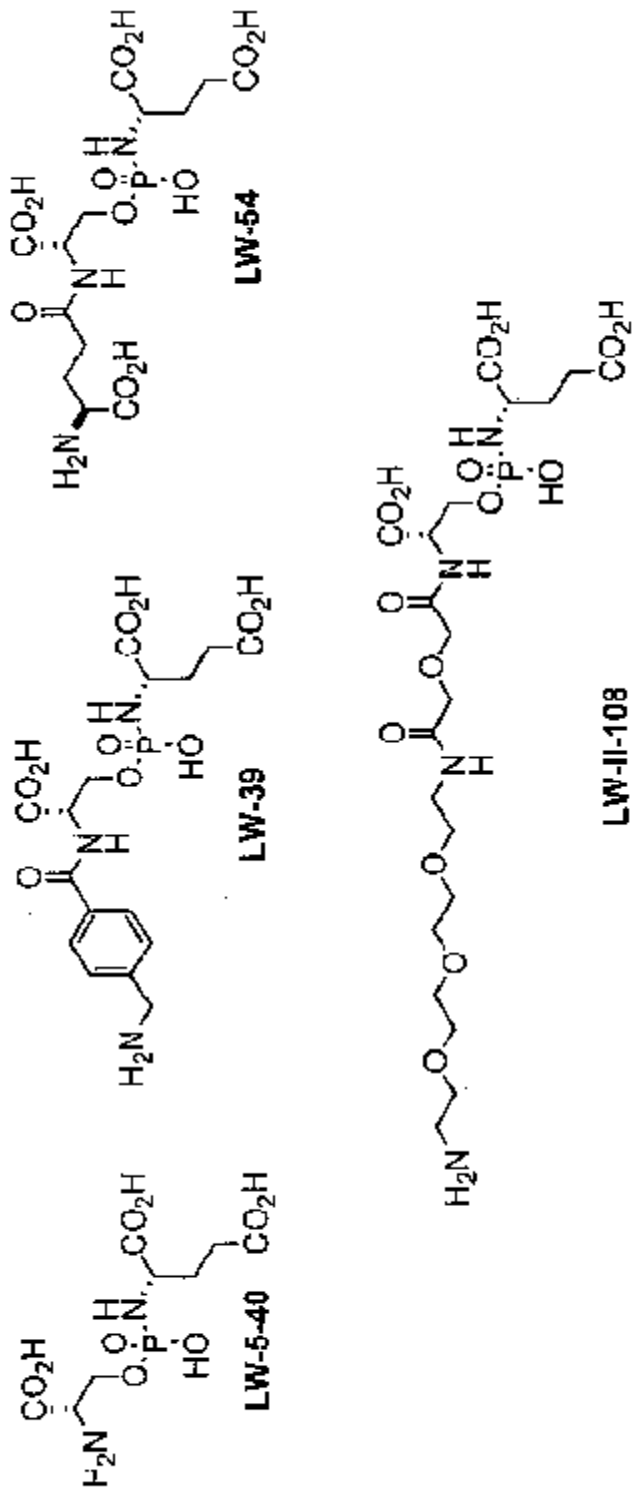


Figure 8

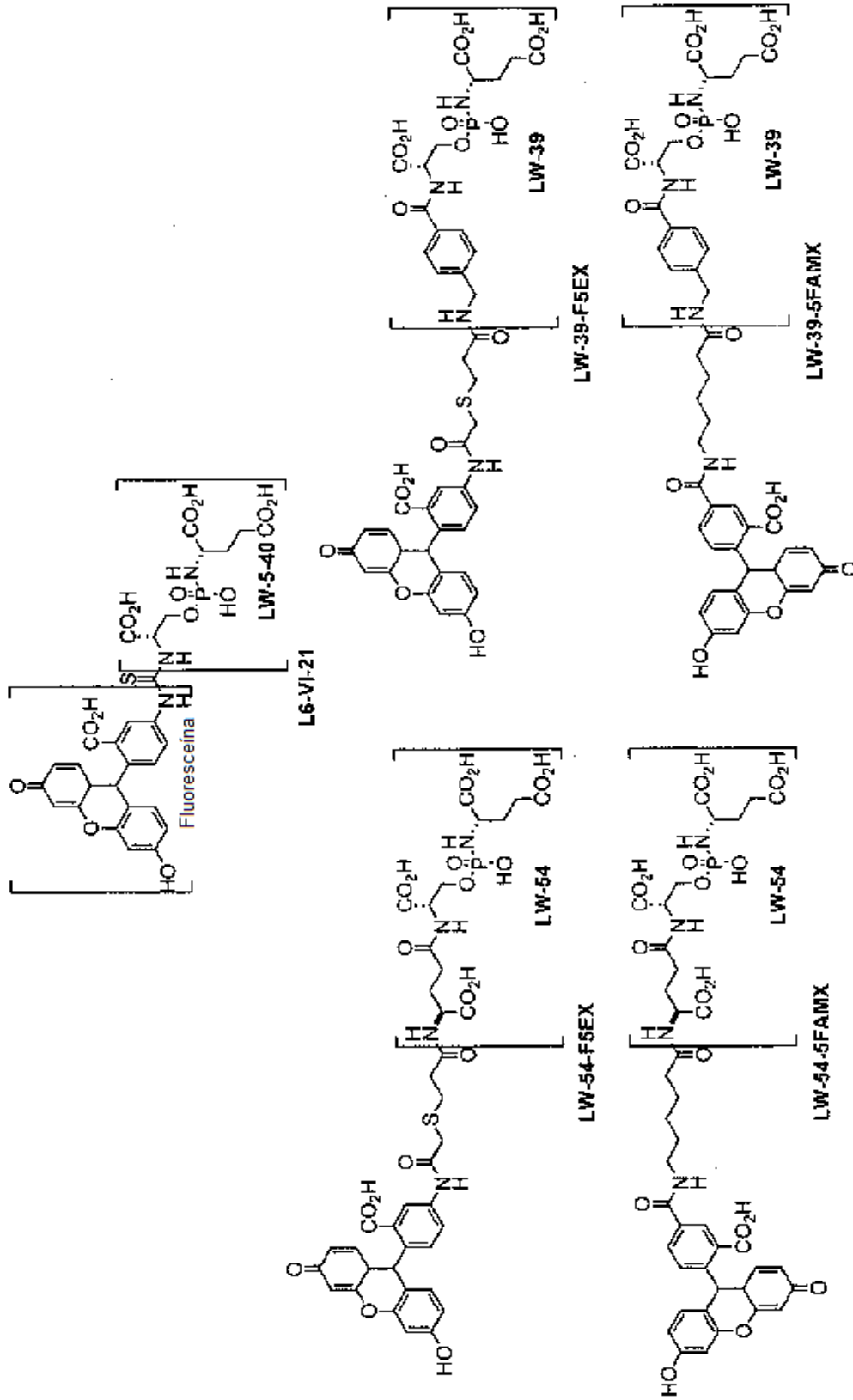


Figura 9

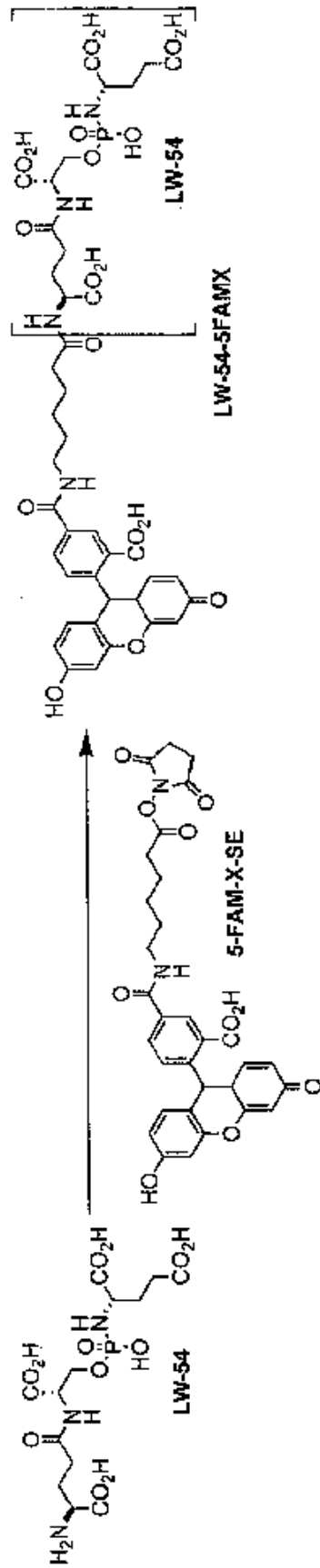


Figure 10

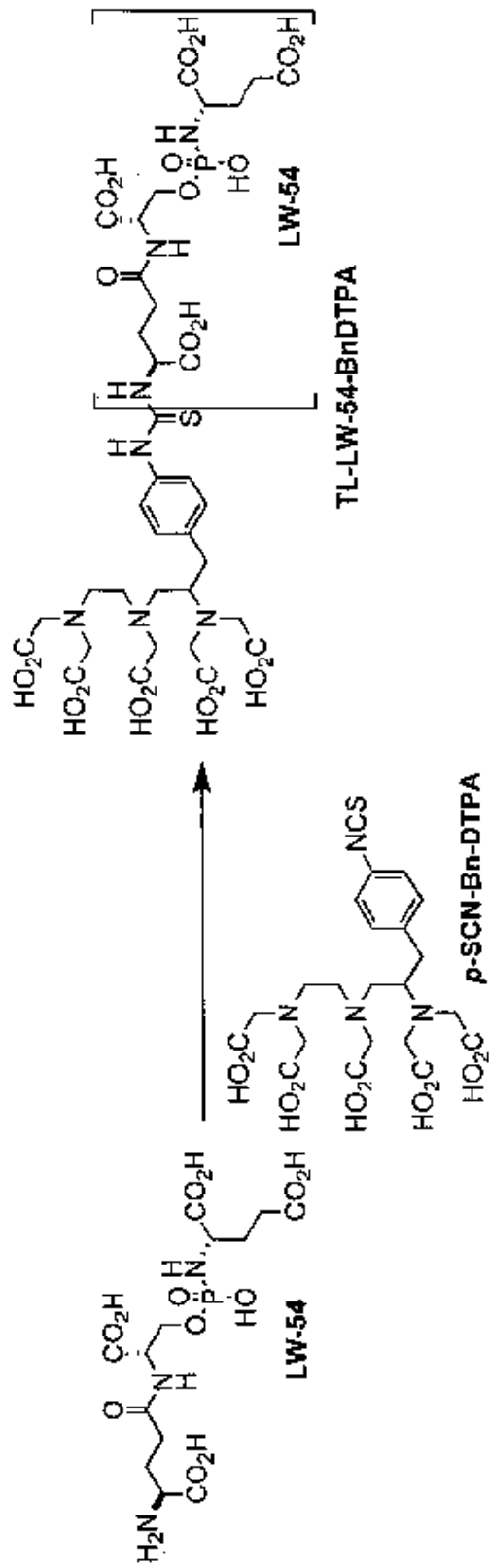


Figure 11

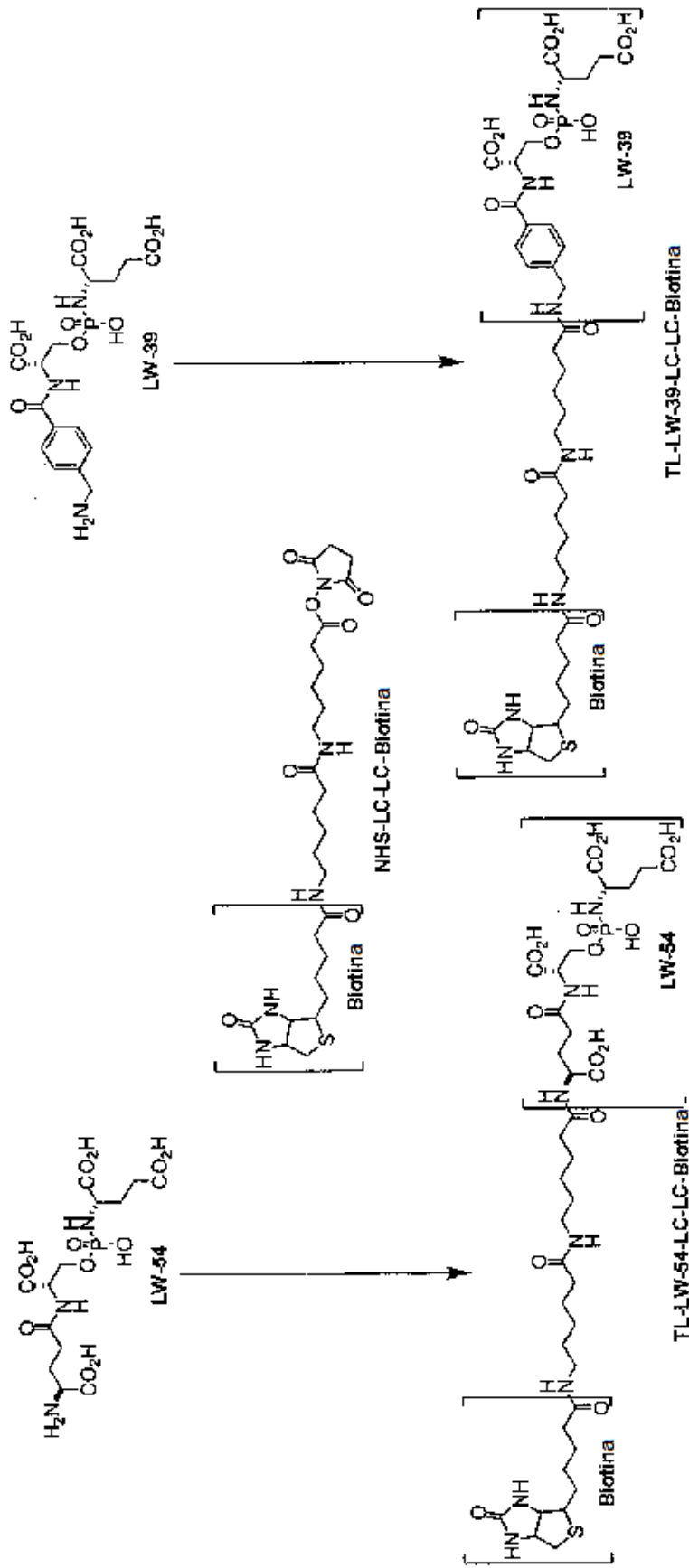


Figura 12