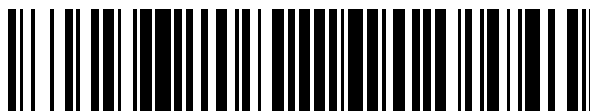


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 481**

51 Int. Cl.:

**A61K 51/00** (2006.01)  
**C07B 59/00** (2006.01)  
**C07C 275/16** (2006.01)  
**C07C 275/24** (2006.01)  
**C07C 275/30** (2006.01)  
**C07C 311/19** (2006.01)  
**C07D 213/38** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2007 E 07844938 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2097111**

54 Título: **Heterodímeros de ácido glutámico**

30 Prioridad:

**08.11.2006 US 857490 P**  
**05.01.2007 US 878678 P**

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

**06.10.2015**

73 Titular/es:

**MOLECULAR INSIGHT PHARMACEUTICALS, INC.**  
**(100.0%)**  
**777 Old Saw Mill River Road**  
**Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**BABICH, JOHN W.;**  
**ZIMMERMAN, CRAIG N. y**  
**MARESCA, KEVIN P.**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 547 481 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).

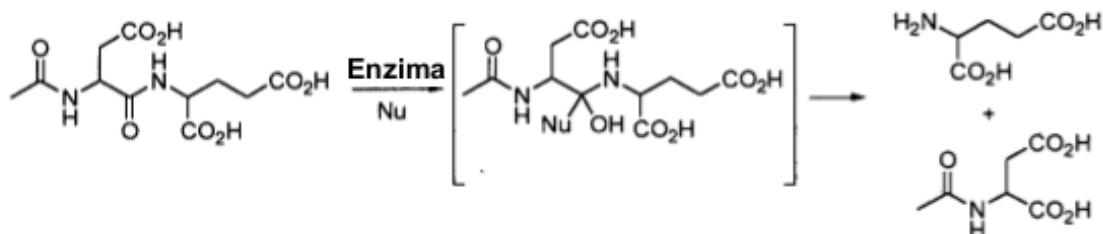
## DESCRIPCIÓN

Heterodímeros de ácido glutámico

5 Antecedentes de la invención

[0001] Al menos 1 millón de hombres padecen cáncer de próstata y se estima que la enfermedad afectará a uno de cada seis hombres de entre 60 y 80 años en EE.UU. Hay más de 300.000 casos nuevos de cáncer de próstata diagnosticados cada año. El cáncer de próstata afectará a uno de cada seis hombres en Estados Unidos y la mortalidad a causa de la enfermedad está en segundo lugar, detrás del cáncer de pulmón. Se estima que actualmente se gastan 2 billones de dólares en todo el mundo en terapias quirúrgicas, de radiación y de medicamentos y en tratamientos mínimamente invasivos, un billón de dólares del gasto es en EE.UU. Actualmente no hay una terapia efectiva para el cáncer de próstata recurrente, metastásico, independiente del andrógeno. Se necesitan nuevos agentes que permitan una visualización rápida del cáncer de próstata y una orientación específica para permitir la radioterapia presente.

15 [0002] La dipeptidasa ácida alfa-enlazada N-acetilada (NAALADasa), también conocida como glutamato carboxipeptidasa II (GCP II) es una neuropeptidasa que escinde N-acetilaspártil-glutamato (NAAG) en N-acetilaspártato y glutamato en el sistema nervioso, véase más abajo, que describe la escisión hidrolítica de NAAG por NAALDasa a través del intermedio tetraédrico. La enzima es una proteína tipo II de la clase co-catalítica de metalopeptidasas, que  
20 contiene dos átomos de zinc en el sitio activo.



[0003] Independientemente de su caracterización en el sistema nervioso, se demostró que una forma de NAALADasa se expresa en altos niveles en adenocarcinomas prostáticos humanos y se designó el antígeno de membrana específica de la próstata (PSMA). El gen NAALADasa/PSMA se conoce por producir múltiples formas de empalme de ARNm y en base a la evidencia inmunohistoquímica precedente, se ha asumido que el cerebro humano y la próstata expresaban isoformas diferentes de la enzima.

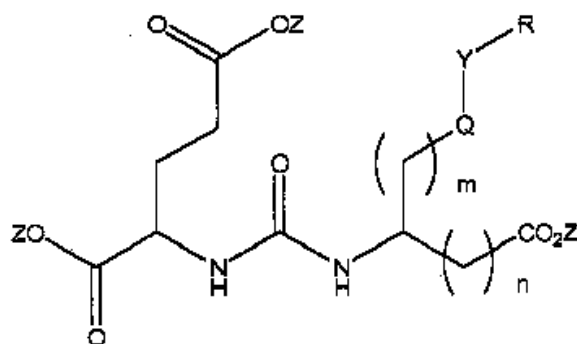
30 [0004] El antígeno de membrana específico de la próstata humano (PSMA), también conocido como folato hidrolasa I (FOLH1), es una glicoproteína transmembrana de tipo II de 750 aminoácidos que se expresa primariamente en el epitelio de la próstata humana normal pero se sobreexpresa en el cáncer de próstata, incluyendo la enfermedad metastásica. PSMA es una exopeptidasa única con reactividad hacia los folatos poli-gamma-glutamados, capaz de eliminar secuencialmente los terminales de poli-gamma-glutamil. Debido a que el PSMA es expresado por prácticamente todos los cánceres de próstata y su expresión aumenta además en carcinomas mal diferenciados, metastásicos y refractarios de hormona, es un objetivo muy atractivo para la formación de imágenes y la terapia de  
35 próstata. El desarrollo de ligandos que interactúan con el PSMA y portan radionúclidos apropiados puede proporcionar una opción de orientación prometedora y nueva para la detección, tratamiento y gestión del cáncer de próstata.

[0005] La forma radioinmunoconjugada del anticuerpo monoclonal anti-PSMA (mAb) 7E11, conocido como el escaneado PROSTASCINT, se usa actualmente para diagnosticar la metástasis y la recurrencia del cáncer de próstata. Los primeros resultados prometedores de varios ensayos de fase I y II han utilizado PSMA como objetivo terapéutico. PROSTASCINT dirige el dominio intracelular de PSMA y se cree que enlaza en su mayoría partes necróticas de tumor de próstata. Más recientemente, se han desarrollado anticuerpos monoclonales que enlazan con el dominio extracelular de PSMA y se han radiomarcado y han demostrado que se acumulan en los modelos de tumor de próstata positivos de PSMA en animales.

[0006] Mientras que los anticuerpos monoclonales son prometedores para la detección y terapia de tumores, ha habido limitados éxitos clínicos fuera del linfoma debido a su baja permeabilidad en tumores sólidos. Miméticos de bajo peso molecular, con permeabilidad más alta en tumores sólidos tendrán una ventaja definida en la obtención de un alto porcentaje por gramo y un alto porcentaje de enlace específico.

Resumen de la invención

[0007] La presente invención se refiere a compuestos de la fórmula (I):



(I)

5 donde R es un arilo sustituido o no sustituido en C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, un heteroarilo sustituido o no sustituido en C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, un alquilo sustituido o no sustituido en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o -NR'R';  
 Q es C(O), O, NR', S(O)<sub>2</sub> o C(O)<sub>2</sub>  
 Y es C(O), O, NR', S(O)<sub>2</sub>, C(O)<sub>2</sub> o (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>;  
 Z es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;  
 m es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;  
 10 n es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6;  
 p es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6;  
 R' es H, un arilo sustituido o no sustituido en C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, un heteroarilo sustituido o no sustituido o un alquilo sustituido o no sustituido en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>;  
 cuando es sustituido, arilo, heteroarilo y alquilo se sustituyen con halógeno, heteroarilo en C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, -NR'R' o COOZ;  
 15 además donde

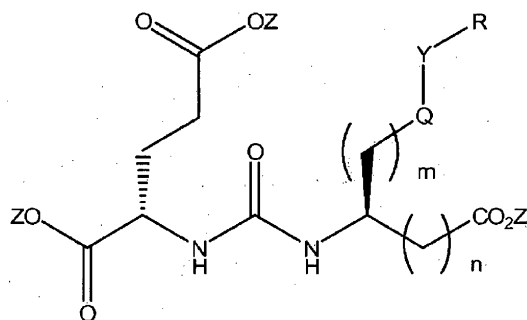
(i) al menos uno de R o R' es un arilo o un heteroarilo sustituido en C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> con un halógeno; o

(ii) al menos uno de R o R' es un heteroarilo;

20 donde el heteroarilo es un heteroarilo en C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, furanilo, tienilo, pirrolilo o imidazolilo, y donde el heteroarilo en C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> es un grupo arilo que tiene de 1 a 3 heteroátomos como átomos de anillo, el resto de los átomos de anillo son átomos de carbono;

o una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto de la fórmula (I).

25 [0008] La presente invención se refiere a compuestos de la fórmula (II):



(II).

[0009] En una forma de realización preferida de los compuestos de la fórmula (I) o (II), n es 0 o 1 y n' es 0 o 1.

30 [0010] La presente invención también se refiere a fracciones de enlace a PSMA de glutamato-urea-lisina y su uso en el tratamiento diagnóstico y terapéutico. En una forma de realización, los análogos basados en urea descritos por la presente son heterodímetro de glutamato-urea-α o heterodímero de β-aminoácido acoplados a través de los grupos α-NH<sub>2</sub> o β-NH<sub>2</sub>. Se pueden incorporar radiomarcadores a la estructura a través de una variedad de grupos protésicos unidos a la cadena lateral de aminoácidos X a través de un enlace de heteroátomo o carbono. Los compuestos de la presente invención son para su uso como agentes de direccionamiento y diagnóstico y agentes terapéuticos para el tratamiento y la gestión del cáncer de próstata y otras enfermedades relacionadas con la inhibición de la NAALADasa.

[0011] Fracciones químicas adecuadas, definiciones de fracciones químicas, excipientes y métodos y formas de administración se pueden encontrar en las solicitudes publicadas en EE.UU. números: 2004/0054190 y 2004/0002478 y las solicitudes internacionales números: WO 02/22627 y WO 03/060523

## Breve descripción de los dibujos

[0012]

5

Las figuras 3A-3B son cromatogramas de HPLC respectivos de reacción cruda de N-[N-[(S)-1,3-dicarboxipropil]carbamoil]-S-3-yodo-L-tirosina (I-131 DCT). Figura 3A, parte superior, purificado a las 2 horas, figura 3B, en el medio y a los 2 días, figura 3C, abajo.

10

Las figuras 4A-4D son cromatogramas de radio-HPLC de I-131 MIP 1072 purificado; a los 3 días en A) DMSO. B) 3% de genstisato-6% ascorbato/ácido ascórbico. C) PBS, pH = 7,2. D) 10% de etanol en la solución salina a 37°C. Como se muestra por encima, el I-131-1072 (valor máximo 12 minutos) permaneció estable en todos los experimentos.

15

La figura 5 muestra I-123 DCIT ligado específicamente a células LNCaP y no a células PC3 (conjunto izquierdo) como es evidente por los recuentos desplazables por compuesto no radiomarcado (conjunto del medio) o PMPA (conjunto derecho) en células LNCaP. Los histogramas muestran la media  $\pm$  SEM, cada experimento fue realizado por duplicado.

La figura 6 es análisis de Scatchard en ensayo de enlace celular de PSMA con ácido 2-{3-[1-carboxi-2-(4-hidroxi-fenil)-etil]-ureido}-pentanodioico (DCT) frío.

La figura 7 muestra valoraciones biológicas de compuestos seleccionados en las células LNCaP positivas en PSMA.

La figura 8 muestra valoraciones biológicas de compuestos de plomo en las células LNCaP positivas en PSMA.

La figura 9 muestra análisis de Scatchard en el ensayo de enlace celular de PSMA con MIP1072.

20

La figura 10 muestra internalización de I-131-MIP1072.

Las figuras 11A y 11B respectivamente muestran estabilidad de I-131 MIP-1072 frente a DCT y Phenacetin en microsomas de rata durante 60 minutos.

La figura 12 muestra biodistribución de tejido del I-131 MIP1072 en los ratones portadores de tumor xenoinjertado.

La figura 13 muestra inhibición de actividad de NAALADasa de lisatos celulares LNCaP.

25

La figura 14 muestra inhibición de actividad de NAALADasa de lisatos celulares LNCaP.

La figura 15 muestra inhibición de actividad de NAALADasa de lisatos celulares LNCaP.

La figura 16 muestra la capacidad de los compuestos de prueba para inhibir la unión de un inhibidor de NAALADasa conocido, 131I-DCIT, a PSMA en células LNCaP se examinó. Las células fueron incubadas con varias concentraciones de compuestos de prueba y 131I-DCIT durante 1 hora, luego se lavaron y contabilizaron para determinar valores IC50.

30

La figura 17 es análisis de enlace directo de MIP-1072.  $^{123}\text{I}$ -MIP-1072 (3 nM, >1,000 mCi/ $\mu\text{mol}$ ) se incubó con células LNCaP positivas de PSMA o células PC3 negativas de PSMA (300.000 células/depósito), tanto en ausencia como en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de MIP-1072 no radioactivo o 10  $\mu\text{M}$  de un inhibidor de PSMA específico (PMPA).

La figura 18 muestra análisis de unión de saturación de  $^{123}\text{I}$ -MIP-1072 en células LNCaP.

La figura 19 muestra internalización de  $^{123}\text{I}$ -MIP-1072.

35

La figura 20 muestra absorción de  $^{123}\text{I}$ -MIP-1072 en los ratones que portan xenoinjerto LNCaP. Se evaluó la biodistribución de tejido de  $^{123}\text{I}$ -MIP-1072 (2  $\mu\text{Ci}$ /ratón, >1,000 mCi/ $\mu\text{mol}$ ) en tejidos seleccionados de ratones lampiños portadores de tumor LNCaP (PSMA positivo). Los resultados se expresan como el porcentaje de la dosis inyectada por gramo de los tejidos seleccionados (%ID/g).

Figura 21. Absorción de  $^{123}\text{I}$ -MIP-1072 en ratones portadores de xenoinjerto LNCaP y PC3. Biodistribución de tejido de  $^{123}\text{I}$ -MIP-1072 (2  $\mu\text{Ci}$ /ratón, >1,000 mCi/ $\mu\text{mol}$ ) se evaluó en tejidos seleccionados de ratones lampiños portadores de tumor LNCaP (PSMA positivo) y PC3 (PSMA negativo) con (bloqueado) o sin (normal) pretratamiento con 50 mg/kg PMPA.

40

## Descripción detallada de la invención

45

## Definiciones

[0013] "Sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia biológica y las propiedades de las bases libres y que se obtienen por reacción con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares.

50

[0014] "Alquilo" se refiere a un hidrocarburo alifático saturado de cadena lineal, ramificada o cíclica. Los grupos alquilo típicos incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, butilo terciario, pentilo, hexilo y similares. El grupo alquilo puede ser opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, ciano o alcoxi. Cuando el grupo alqui es un R' sustituyente, es un alquilo inferior de 1 a 6 carbonos, de forma más preferible 1 a 4 carbonos.

55

[0015] "Arilo" se refiere a un grupo aromático que tiene al menos un anillo con un sistema de electrones pi conjugado e incluye arilo carbocíclico, arilo heterocíclico y grupos de biarilo. El grupo arilo puede ser opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en halógeno, trihalometilo, hidroxilo, SH, OH, NO<sub>2</sub>, amina, tioéter, ciano, alcoxi, alquilo y amino. Ejemplos de grupos arilo incluyen grupos fenilo, naptilo y antracilo. Se prefieren los grupos fenilo y fenilo sustituido.

60

[0016] "Heteroarilo" se refiere a un grupo arilo que tiene de 1 a 3 heteroátomos como átomos de anillo, el resto de los átomos de anillo son carbono. Los heteroátomos incluyen oxígeno, azufre y nitrógeno. Así, grupos arilo heterocíclico incluyen furanilo, tienilo, piridilo, pirrolilo, N-alquilo pirrolo inferior, pirimidilo, piracinilo, imidazolilo y similares.

## 5 Síntesis

[0017] Todas las reacciones fueron efectuadas en cristalería seca bajo una atmósfera de argón a menos que se indique lo contrario. Las reacciones fueron purificadas por cromatografía en columna, bajo presión media utilizando un Biotage SP4 o por cromatografía en fase líquida de alta presión preparatoria.

10

[0018]  $^1\text{H}$  RMN fue registrado en un instrumento Bruker 400 MHz. Espectros se proporcionan como ppm  $\delta$  y se referencian a las resonancias de solvente en  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-}d_6$  o  $\text{methanol-}d_4$ . Todos los solventes se compraron en Sigma-Aldrich. Los reactivos se compraron en Sigma Aldrich, Bachem, Akaal, Fisher, Alfa Aesar, Acros y Anaspec. Se usaron las siguientes abreviaturas: cloruro de metileno (DCM), acetato de etilo (EA), hexanos (Hex), dicloroetano (DCE), dimetilformamida (DMF), ácido trifluoroacético, (TFA) tetrahidrofurano (THF), carbonildiimidazol (CDI), dimetilaminopiridina (DMAP), trietilamina (TEA), metil trifluorometanosulfonato (MeOTf), ácido (S)-2-amino-6-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-hexanoico (dpK), ácido glutámico (Glu), diisopropiletilamina (DIEA), benciloxicarbonil (CBZ).

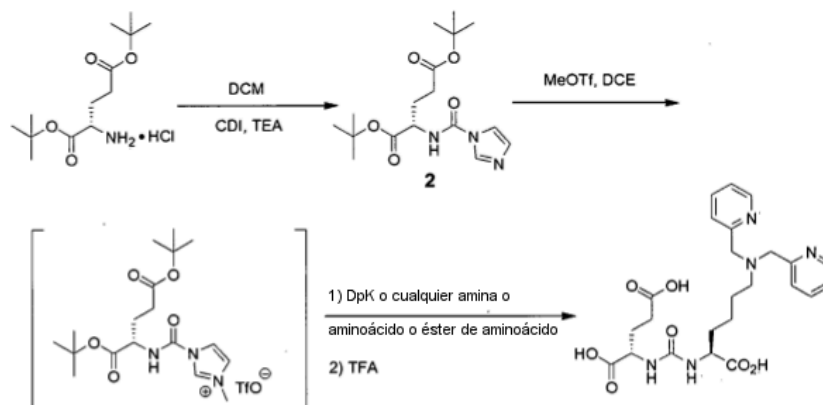
15

## 20 Síntesis de productos intermedios

20

[0019] Los siguientes compuestos se prepararon todos en rendimientos totales variando de 20-40% después de la vía representada en el esquema 1. El primer paso, realizado a  $0^\circ\text{C}$  bajo condiciones inertes utilizó el di-*t*-butil éster del ácido glutámico con CDI en presencia de base para formar el derivado Glu-urea-imidazol intermedio 2. Este intermedio fue activado con MeOTf bajo condiciones básicas para producir el imidazol metilado 3, que bajo condiciones inertes reaccionó fácilmente con aminas. Los grupos protectores de *tert*-butil éster se eliminaron usando 20% de TFA en DCM durante 1 a 4 horas a temperatura ambiente. Tras la finalización de la desprotección, las reacciones se concentraron en un evaporador giratorio o se soplaron en seco con nitrógeno y purificaron o recrystalizaron en una columna de sílice. Los productos finales fueron evaluados *in vivo* e *in vitro*.

25



Esquema I. Ruta general para la síntesis de compuestos de PSMA.

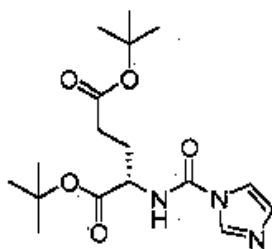
30

## Ácido L-(S)-2-[(imidazol-1-carbonil)-amino]-pentanodioico di-*tert*-butil éster (2)

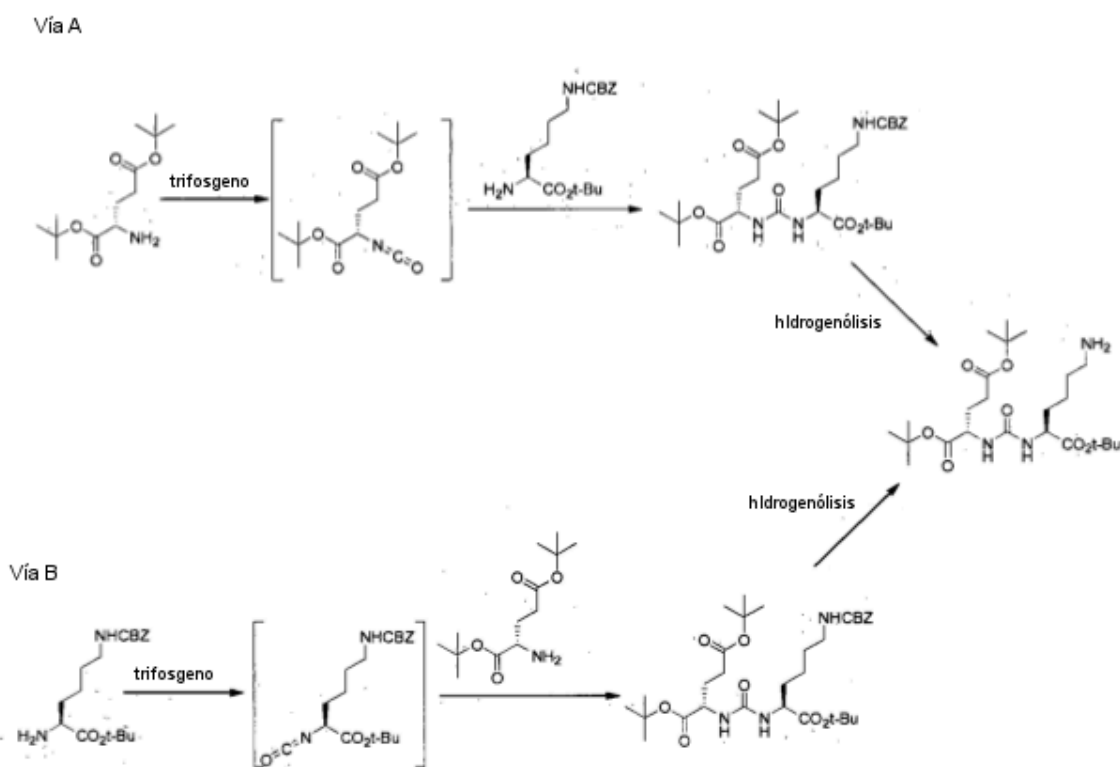
35

[0020] A una suspensión de hidrocloreto de di-*t*-butil glutamato (15,0 g, 51 mmol) en DCM (150 mL) enfriada a  $0^\circ\text{C}$  se añadió TEA (18 mL) y DMAP (250 mg). Después de agitar durante 5 min. se añadió CDI (9,0 g, 56 mmol) y la reacción se agitó durante toda la noche con calentamiento a temperatura ambiente. La reacción fue diluida con DCM (150 mL) y lavada con bicarbonato sódico saturado (60 mL), agua (2 X 100 mL) y solución salina (100mL). La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio y concentrada para dar el producto bruto como un semi sólido, que lentamente se solidificó en reposo. El material bruto fue triturado con hexano/etil acetato para dar un sólido blanco que fue filtrado, lavado con hexano (100 mL) y secado para dar el producto deseado (15,9 g, 45 mmol, 88%) como un sólido blanco.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  7,63 (s, 1H), 7,00 (br, 2H), 6,31 (d, 1H), 4,02 (m, 1H), 2,19 (m, 2H), 1,86 (m, 1H), 1,67 (m, 1H), 1,39 (s, 9H), 1,38 (s, 9H). ESMS  $m/z$ : 354 (M+H) $^+$ .

40



[0021] Alternativamente, los análogos se pueden preparar a través del isocianato generado in situ usando trifosgeno. Este método se puede realizar bien por activación del residuo de glutamato y acoplamiento con un residuo de lisina (vía A) o por activación del residuo de lisina y acoplamiento de éste con el glutamato (vía B) como se muestra en el esquema 2 a continuación.



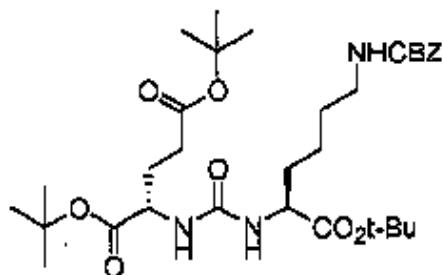
Esquema 2

10 Ácido L-(S,S)-2-[3-(5-benciloxycarbonylamino-1-tert-butoxycarbonyl-pentil-ureido)-pentanodioico di-tert-butil éster (3)

[0022] Vía A. En un matraz de fondo redondo se combinaron 1,8 mL de TEA (13,2 mmol) con 1,8 gramos (6 mmol) de ácido L-glutámico di-tertbutil éster hidrocloreuro en 20 mL de DCM. Esta solución se añade gota a gota durante 45 minutos a una solución de 10 mL de DCM y trifosgeno (0,7 g, 2,2 mmol) a 0°C. Después de agitar durante 30 min. más una solución de H-lis-(Z)-O-t-butil éster HCl (2,2 g, 6 mmol) que contiene TEA (1,8 mL, 13 mmol) en 15 mL DCM se añadió en una parte. La solución se agitó durante 1 hora. La reacción es concentrada, diluida con 50 mL de acetato de etilo, lavada 2N NaHSO<sub>4</sub> (2x 50 mL), solución salina (50 mL) y secada sobre sulfato de sodio para producir un aceite amarillo. Purificación por cromatografía en columna para dar el producto deseado como un aceite claro con reposo solidifica a un sólido blanco (1,9 g, 54%).

[0023] Vía B. En un matraz de fondo redondo se suspende trifosgeno (2,9 g, 10 mmol) en DCM (50 mL) y se agita a 0°C. Una solución de H-Lisina(Z) base libre (9,1 g, 27 mmol) y DIEA (10,4 mL, 60 mmol) DCM (50 mL) se añadió gota a gota a la solución de trifosgeno durante 2,5 horas. Después de 2,5 horas una solución de ácido L-glutámico di-tertbutil éster hidrocloreuro (8 g, 27 mmol) que contiene DIEA (10,4 mL, 60 mmol) DCM (50 mL) se añadió en una parte y se dejó agitar durante 45 minutos. La reacción fue concentrada hasta que se secó, diluida con 150 mL de acetato de etilo, lavada con 2N NaHSO<sub>4</sub> (2x 200 mL), solución salina (150 mL) y secada sobre sulfato de sodio para producir un aceite amarillo. Este aceite fue purificado por cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>) para dar el producto deseado como un aceite

claro que en reposo solidifica a un sólido blanco (12,0 g, 72%).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,34 (m, 5H), 5,33-5,28 (m, 3H), 5,08 (d,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 4,38-4,29 (m, 2H), 3,15 (m, 2H), 2,32-2,01 (m, 2H), 1,90-1,50 (m, 8H), 1,43-1,40 (m, 27H, *t*-Bu). ESMS  $m/z$ : 622 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

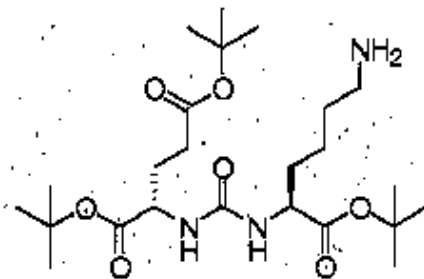


5

Ácido 2-[3-(5-amino-1-tert-butoxycarbonyl-pentil)-ureido]-pentanodioico di-tert-butil éster (4).

10

[0024] A una solución de ácido 2-[3-(5-benziloxycarbonylamino-1-tert-butoxycarbonyl-pentil)-ureido]-pentanodioico di-tert-butil éster (630 mg, 1,0 mmol) en etanol (20 mL) se añadió formiato de amonio (630 mg, 10 eqv) seguido de 10% Pd-C y la suspensión se dejó reposar con agitación ocasional durante toda la noche hasta que se completó. La reacción fue filtrada a través de celita y concentrada para dar el producto deseado (479 mg, 98%) como un sólido ceroso.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,15-6,0 (bm, 4H, NH), 4,29 (m, 2H), 3,02 (m, 2H), 2,33 (m, 2H), 2,06-1,47 (m, 8H), 1,45-1,40 (m, 27H, *t*-Bu). ESMS  $m/z$ : 488 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

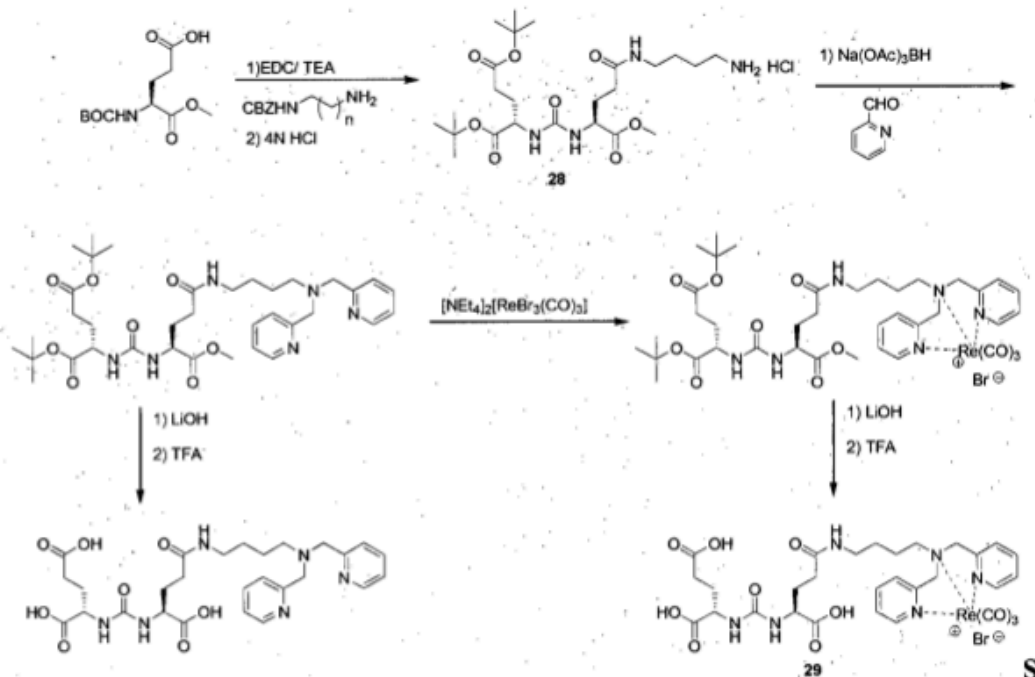


15

Síntesis de compuestos modelo de núcleo de Glu-Urea-Glu Téter.

20

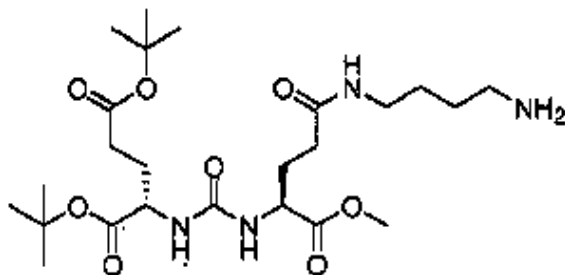
[0025] En esta serie un téter se incorpora sobre la cadena lateral de ácido glutámico o lisina antes de la conjugación para formar el dímero de urea. En el ejemplo a continuación el ácido carboxílico de cadena lateral de uno de los ácidos glutámicos se modifica en un téter para anexar un quelador, átomo o grupo funcional que sea o contenga un radionucleido (esquema 4).



Esquema 4

Ácido 2-{3-[3-(4-amino-butylcarbamoil)-1-metoxicarbonil-propil]-ureido}-pentanodioico di-tert-butil éster (28)

- 5 [0026] A una solución de *N*-BOC ácido glutámico  $\alpha$ -metil éster BOC-Glu(OH)-Ome (960 mg, 3,7 mmol) en DMF (6 mL) enfriado a 0°C fue añadido EDC (845 mg, 1,3 eqv) y TEA (1,3 mL). Después de agitar durante 10 min la diamina *N*-CBZ-1,4-diaminobutano sal de hidrocloreuro mono protegida (1 g, 3,8 mmol) se añadió y la reacción se dejó agitar durante toda la noche con calentamiento a temperatura ambiente. La reacción cruda fue diluida con EA (100 mL) y lavada con y lavada con agua (30 mL), 5% aq. Ácido cítrico (30 mL), sat. bicarbonato sódico (30 mL), agua (30 mL) y solución salina (30 mL). La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio y concentrada para dar el producto bruto como un jarabe espeso (2,1 g). Al jarabe obtenido se añadió 4 N HCl en dioxano (10 mL) y la reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 3 h. La concentración proporcionó un sólido ceroso (1,8 g) como la sal de hidrocloreuro. La sal fue acoplada al ácido *L*-(*S*)-2-[(imidazol-1-carbonil)-amino]-pentanodioico di-tert-butil éster (2) activado como se describe en las secciones experimentales precedentes para dar el dímero *x* totalmente protegido deseado (1,9 g). Este material fue suspendido en EtOH absoluto (20 mL) formiato de amonio de exceso (5 g) adicionado seguido de 20% Pd(OH)<sub>2</sub> en el carbono (100 mg) y la suspensión se agitó muy despacio durante toda la noche para efectuar la escisión del grupo de protección CBZ. La filtración a través de celita y la concentración proporcionaron la amina libre deseada (1,4 g, 2,7 mmol, 73%, 4 pasos). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,41 (br, 2H), 7,36 9br, 1H), 6,44 (bs, 1H), 6,37 (bs, 1H), 4,37-4,29 (m, 2H), 3,71 (s, 3H), 3,20-1,50 (m, 16H), 1,45 (s, 9H), 1,43 (s, 9H). ESMS *m/z*: 517 (M+H)<sup>+</sup>.
- 20

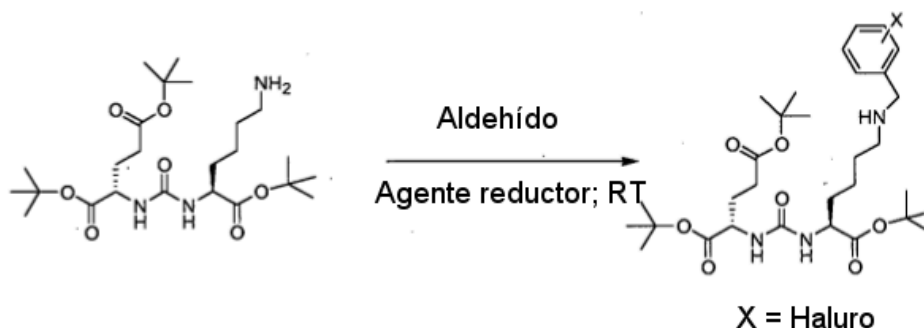


Síntesis de compuestos modelo de núcleo de Glu-urea-X-bencil-Lisina.

- 25 [0027] Los siguientes compuestos fueron todos preparados en rendimientos totales que variaron de 20-40% usando la vía representada en el esquema 3. La Glu-urea-lisina *Z*-desprotegida fue mezclada con el aldehído apropiado (0,9 equivalentes) a temperatura ambiente durante una hora para formar la base de Schiff intermedia. La base de Schiff fue reducida usando 1 equivalente de triacetoxiborohidruro de sodio. Los compuestos fueron desprotegidos usando 50% de



TFA en DCM durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la finalización, las reacciones fueron concentradas en un evaporador giratorio o fueron sopladas a seco con nitrógeno y extraídas usando cloruro de metileno y agua. La capa de agua fue evaporada a seco para dar el producto desprotegido en 40-80% de rendimiento.

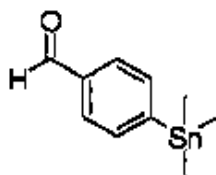


**Esquema 3. Vía general para la síntesis de compuestos de PSMA halogenados. 4-Trimetilstananil-benzaldehído (5).**

5

[0028] A una solución de 4-iodobenzaldehído (1,92 g, 8,27 mmol) en dioxano seco (60 mL) se añadió hexametilditina (4,1 mL, 19,8 mmol) seguido de Pd(Ph<sub>3</sub>P)Cl<sub>2</sub> (150 mg) y la mezcla reactiva se calentó durante 3 h bajo reflujo hasta que se consideró completa. La reacción fue filtrada a través de celita y purificada por cromatografía en columna utilizando hexano/etil acetato (9/1) como eluyente para dar (2,24 g, 98%) como un aceite claro. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,97 (s, 1H), 7,81 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,72 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 0,29 (s, 9H). ESMS m/z: 268 (Sn-agrupamiento).

10



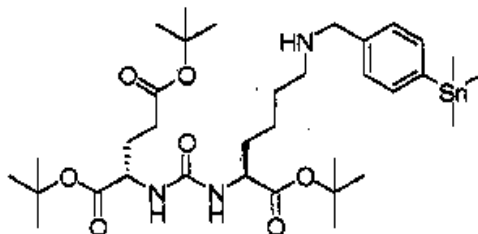
15

Ácido 2-[3-[1-tert-butoxicarbonil-5-(4-trimetilstananil-bencilamino)-pentil]-ureido]-pentanodioico di-tert-butil éster (6).

20

[0029] A una solución de ácido 2-[3-(5-amino-1-tert-butoxicarbonil-pentil)-ureido]-pentanodioico di-tert-butil éster (150 mg, 0,31 mmol) en DCE (10 mL) se añadió 4-Trimetilstananil benzaldehído (82 mg, 0,31 mmol) seguido de triacetoxiborohidruro de sodio (98 mg, 0,47 mmol) y la reacción se agitó durante toda la noche a 40°C. La reacción fue concentrada y purificada por cromatografía en columna utilizando hexanos/etil acetato como eluyente para dar el producto deseado (88 mg, 38%) como un jarabe espeso que empieza a solidificar con el reposo. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,48 (d, J = 7,4 Hz, 2H), 7,30 (d, J = 7,4 Hz, 2H), 6,27 (m, 2H, NH), 3,96 (m, 4H), 2,74 (bm, 2H), 2,21 (m, 2H), 1,87 (m, 2H), 1,65-1,19 (m, 7H), 1,35 (m, 27H, t-Bu), 0,23 (s, 9H). ESMS m/z: 742 (Sn-agrupamiento).

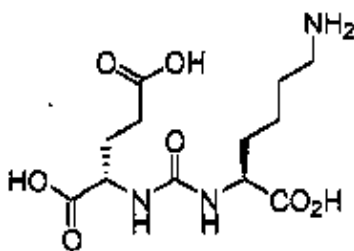
25



Ácido (S, S)-2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico (7) (MIP 1033)

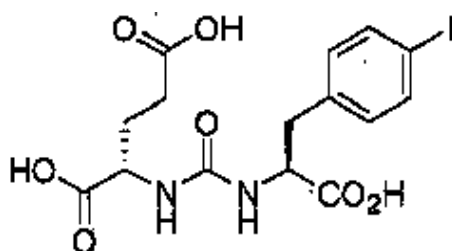
30

[0030] El mismo procedimiento experimental que se representa en el esquema 1, produjo 8% de ácido 2-[3-(5-benciloxicarbonilamino-1-tert-butoxicarbonil-pentil)-ureido]-pentanodioico di-tert-butil éster. El compuesto fue desprotegido utilizando los métodos previamente descritos y purificado por HPLC para dar el producto deseado. <sup>1</sup>H RMN (tri-*t*-butil éster de amina Z-protegida) (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 12,2 (s, 3H), 6,4 (s, 2H), 4,15 (m, 2H), 3,45 (m, 1H), 2,75 (bs, 1H), 2,2 (m, 4H), 1,90 (m, 2H), 1,65 (m, 2H), 1,50 (s, 2H), 1,35 (m, 2H). ESMS m/z: 622 (M-H)<sup>+</sup>.



Ácido (S)-2-{3-[1-carboxi-2-(4-iodo-fenil)-etil]-ureido}-pentanodioico (11) (MIP-1034).

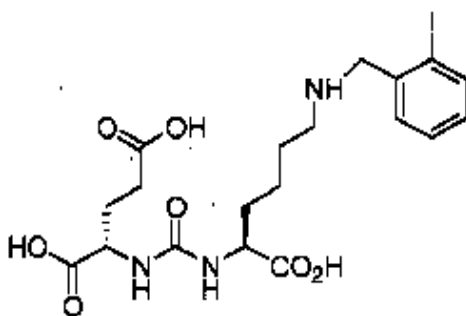
- 5 [0031] El mismo procedimiento experimental que en la síntesis general, produjo 0,038 g, 5% de ácido 2-{3-[1-carboxi-2-(4-iodo-fenil)-etil]-ureido}-pentanodioico di-*tert*-butil éster. El compuesto fue desprotegido utilizando los métodos previamente descritos.  $^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12,40 (s, 3H), 7,65 (dd, 2H), 7,05 (dd, 2H), 6,30 (m, 2H), 4,25 (s, 1H), 4,05 (s, 1H), 2,90 (m, 2H), 2,2 (m, 2H), 1,80 (m, 2H). ESMS  $m/z$ : 429 ( $\text{M}^+$ ), 451 ( $\text{M}+\text{Na}$ ).



10

Ácido (S, S)-2-{3-[1-carboxi-5-(2-iodo-bencilamino)-pentil]-ureido}-pentanodioico (12) (MIP 1035).

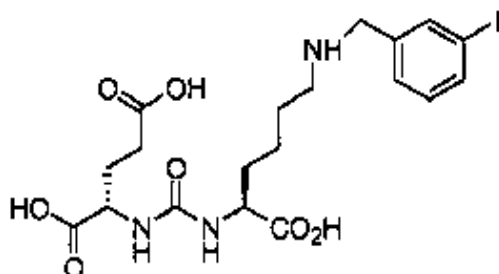
- 15 [0032] El mismo procedimiento general, usando el ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico di-*t*-butil éster previamente preparado y protegido. El compuesto fue desprotegido utilizando los métodos previamente descritos (5,5 mg, 66%).  $^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12,4 (s, 3H), 8,8 (s, 1H), 7,94 (m, 1H), 7,5 (m, 1H), 7,16 (t, 1H), 6,38 (m, 2H), 4,15 (m, 5H), 3,06 (s, 2H), 2,85 (s, 1H), 2,2 (m, 2H), 1,90 (m, 1H), 1,70 (m, 2H), 1,50 (s, 2H), 1,35 (m, 2H). ESMS  $m/z$ : 536 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .



20

(S, S)-2-{3-[1-carboxi-5-(3-iodo-bencilamino)-pentil]-ureido}-pentanodioico (13) (MIP 1089).

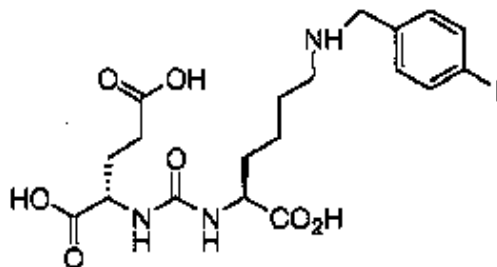
- 25 [0033] El mismo procedimiento general, usando ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico di-*t*-butil éster previamente preparado y protegido. El compuesto fue desprotegido utilizando los métodos previamente descritos (4,1 mg, 53%).  $^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12,4 (s, 3H), 8,7 (s, 2H), 7,9 (s, 1H), 7,8 (d, 1H), 7,44 (d, 1H), 7,22 (t, 1H), 6,25 (s, 2H), 4,09 (m, 5H), 2,89 (s, 1H), 2,75 (s, 1H), 2,2 (d, 2H), 1,90 (m, 2H), 1,65 (m, 2H), 1,40 (m, 2H).



30

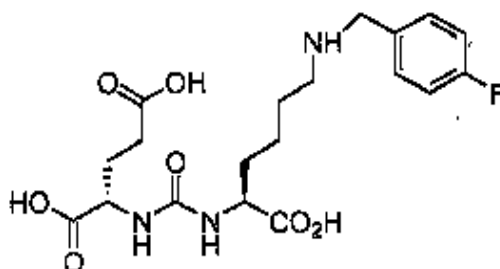
(S, S)-2-{3-[1-carboxi-5-(4-iodo-bencilamino)-pentil]-ureido}-pentanodioico (14) (MIP 1072).

[0034] El mismo procedimiento general, usando ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico di t-butil éster previamente preparado y protegido. El compuesto fue desprotegido utilizando los métodos previamente descritos (12 mg, 66%).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12,4 (bs, 3H), 8,8 (br, 1H), 7,8 (d, 2H), 7,27 (d, 2H), 6,35 (br, 2H), 4,1 (m, 4H), 2,89 (m, 2H), 2,2 (d, 2H), 1,90 (m, 2H), 1,65 (m, 4H), 1,35 (m, 2H). ESMS  $m/z$ : 536 (M+H) $^+$ .



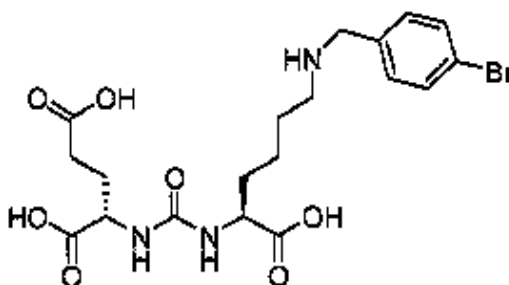
(S, S)-2-[3-[1-carboxi-5-(4-fluoro-bencilamino)-pentil]-ureido]-pentanodioico (15) (MIP 1090).

[0035] El mismo procedimiento general, usando ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico di t-butil éster previamente preparado y protegido. El compuesto fue desprotegido utilizando los métodos previamente descritos.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12,4 (br, 3H), 8,7 (br, 1H), 7,5 (m, 2H), 7,3 (m, 2H), 6,35 (m, 2H), 4,1 (m, 4H), 2,9 (m, 2H), 2,2 (d, 2H), 1,90 (m, 2H), 1,60 (m, 4H), 1,35 (m, 2H). ESMS  $m/z$ : 428 (M+H) $^+$ , 450 (M+ Na).



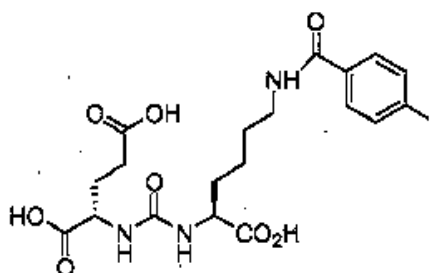
(S, S)-2-[3-[1-carboxi-5-(4-bromo-bencilamino)-pentil]-ureido]-pentanodioico (16) (MIP 1094).

[0036] El mismo procedimiento general, usando ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico di t-butil éster previamente preparado y protegido.  $^1\text{H}$  RMN (tri t-butil éster) (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,52 (d, 2H), 7,32 (d, 2H), 6,28 (m, 2H), 3,98 (m, 2H), 2,55 (t, 2H), 2,48 (t, 2H), 2,22 (m, 2H), 1,85 (m, 2H), 1,62 (m, 2H), 1,45 (m, 2H), 1,37 (s, 27H), 1,28 (m, 2H) ESMS  $m/z$ : 642 (M+H) $^+$ . El compuesto fue desprotegido utilizando los métodos previamente descritos. ESMS  $m/z$ : 474 (M+H) $^+$ .



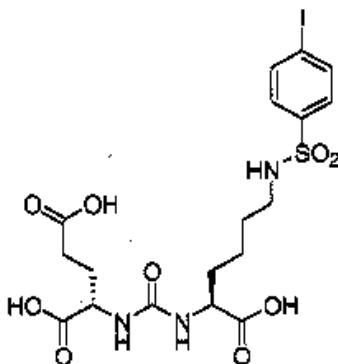
Ácido (S, S)-2-[3-[1-carboxi-5-(4-iodo-bencilamino)-pentil]-ureido]-pentanodioico (17) (MIP 1044).

[0037] El mismo procedimiento general, usando ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico di t-butil éster previamente preparado y protegido. El compuesto fue desprotegido utilizando los métodos previamente descritos.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12,4 (s, 3H), 8,45 (s, 1H), 7,8 (dd, 2H), 7,6 (dd, 2H), 6,3 (s, 2H), 5,75 (s, 1H), 4,1 (m, 4H), 3,2 (s, 2H), 2,25 (d, 2H), 1,90 (m, 1H), 1,65 (m, 2H), 1,4 (m, 2H).



Ácido 2-[3-[1-carboxi-5-(4-iodo-bencenosulfonilamino)-pentil]-ureido]-pentanodioico (18). (MIP 1097).

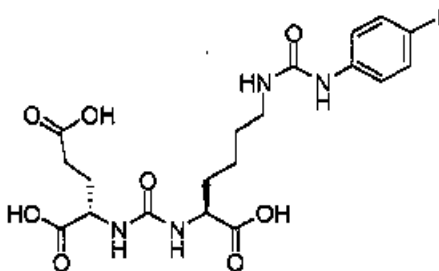
- 5 [0038] En un matraz de fondo redondo ácido se suspende 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico di-*t*-butil éster (300 mg, 0,62 mmol) en agua (10 mL) y 1,4 dioxano (10 mL) y TEA (1,75 mL, 1,25 mmol) se añadió seguido de cloruro de 4-iodo-bencenosulfonilo y la mezcla se agitó durante toda la noche a 50°C. La mezcla reactiva fue evaporada a seco, absorbida en DCM y cromatografiada sobre gel de sílice para dar el producto deseado (375 mg, 80%) como un aceite claro. El compuesto fue desprotegido utilizando los métodos previamente descritos seguidos de purificación por HPLC para dar el producto deseado MIP-1097 como un sólido más blanco (270 gramos, 90% rendimiento). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,97 (d, 2H), 7,68 (t, 1H), 7,53 (d, 2H), 6,35 (dd, 2H), 4,10 (m, 1H), 4,00 (m, 1H), 2,65 (m, 2H), 2,22 (m, 2H), 1,9 (m, 1H), 1,7 (m, 1H), 1,55 (m, 1H), 1,45 (m, 1H), 1,35 (m, 2H), 1,25 (m, 2H), (3 CO<sub>2</sub>H no visto). ESMS *m/z*: 565 (M+H)<sup>+</sup>.
- 10



15

Ácido 2-(3-[1-carboxi-5-[3-(4-iodo-fenil)-ureido]-pentil]-ureido)-pentanodioico (19) (MIP 1095)

- 20 [0039] En un matraz de fondo redondo 4-iodo-fenil se disuelve isocianato (100 mg, 0,41 mmol) en DCM (10 mL) que contenía TEA (0,057 mL, 0,4 mmol). Ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureido] pentanodioico di *t*-butil éster (200 mg, 0,41 mmol) fue añadido y agitado durante 3 horas. La mezcla reactiva fue evaporada a seco y la mezcla cruda absorbida en metanol (5 mL). La adición gota a gota al agua (20 mL) dio un precipitado blanco que fue recogido y lavado con agua (20 mL) y secado para proporcionar el tri-*t*-butil éster deseado como un sólido blanco que fue desprotegido directamente utilizando el método descrito previamente para dar el producto deseado (158 mg, 53%) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,51 (s, 1H), 7,5 (d, 2H), 7,22 (d, 2H), 6,3 (t, 2H), 6,16 (t, 1H), 4,05 (m, 2H), 3,05 (m, 2H), 2,24 (m, 2H), 1,9 (m, 1H), 1,68 (m, 2H), 1,52 (m, 1H), 1,38 (m, 2H), 1,28 (m, 2H), (3 CO<sub>2</sub>H no visto). ESMS *m/z*: 565 (M+H)<sup>+</sup>.
- 25

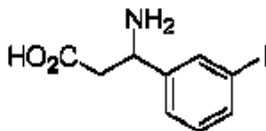


30

Síntesis de Glu-Urea-β-Fenil Glicinas

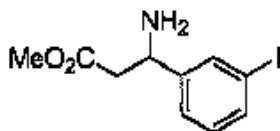
Ácido (±)3-amino-3-(3-iodo-fenil)-propiónico (20).

[0040] Ácido malónico (2,2 g, 21,5 mmol) y 3-iodobenzaldehído (5 g, 21,5 mmol) fueron suspendidos en etanol (50 mL) y acetato amónico (1,66 g, 21,5 mmol) fue añadido y la reacción se calentó a un reflujo durante toda la noche. La reacción fue enfriada a temperatura ambiente, filtrada y lavada con etanol seguido de éter y secada para dar el producto (3,4 g, 11,6 mmol, 54%) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,80 (s, 1H), 7,64 (dd, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,42 (dd, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,16 (dd, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,14 (dd, *J* = 7,6 Hz, 1H), 4,21 (m, 1H), 2,36 (m, 2H).



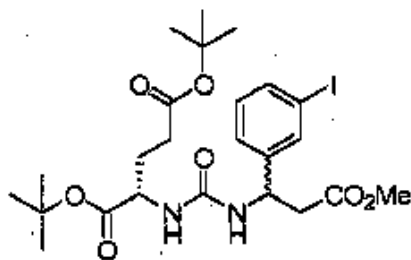
10 Ácido (t)-3-amino-3-(3-iodo-fenil)-propiónico metil éster (21).

[0041] A una suspensión de ácido (±)3-amino-3-(3-iodo-fenil)-propiónico (3,1 g, 10,6 mmol) en metanol se añadió cloruro de tionilo (0,95 mL, 12,7 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. Concentración seguida de trituración con éter da un sólido blanco. El sólido es filtrado, lavado con éter y secado para dar el producto deseado (3,5 g, 10 mmol, 95%) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,79 (br, 2H), 8,01 (s, 1H), 7,74 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,57 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,21 (dd, *J* = 8,1,7,8 Hz, 1H), 4,56 (br, 1H), 3,54 (s, 3H), 3,23-3,17 (m, 1H), 3,04-2,98 (m, 1H).



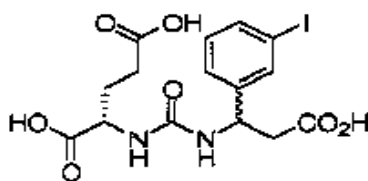
20 Ácido (S, R) y (S, S)-2-{3-[1-(3-iodo-fenil)-2-metoxicarbonil-etil]-ureido}-pentanodioico di-tert-butil éster (22).

[0042] Ácido 2-[(imidazol-1-carbonil)-amino]-pentanodioico di-tert-butil éster (370 mg, 1,05 mmol) fue disuelto en DCE (10 mL) y enfriado a 0°C. MeoTf (142 µL, 1,25 mmol) fue añadido y la reacción se dejó continuar durante 20 min. Ácido (±)3-amino-3-(3-iodo-fenil)-propiónico metil éster (356 mg, 1,045 mmol) se añadió y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y luego se calentó a 55°C y agitó durante toda la noche. La reacción fue diluida con DCM (50 mL) y lavada con agua (30 mL), 5% aq. Ácido cítrico (30 mL), sat. bicarbonato sódico (30 mL), agua (30 mL) y solución salina (30 mL). La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio y concentrada para dar el producto bruto. El producto fue purificado por cromatografía en columna para dar el producto deseado (303 mg, 0,51 mmol, 49%) como una espuma blanca. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,66 (s, 1H), 7,57 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,07-7,02 (m, 1H), 5,74 (br, 1H), 5,17 (br, 2H), 4,30 (m, 1H), 3,63 (s, 1,5H), 3,62 (s, 1,5H), 2,88-2,76 (m, 2H), 2,38-2,24 (m, 2H), 2,10-2,00 (m, 1H), 1,90-1,80 (m, 1H), 1,46 (s, 9H), 1,44 (s, 9H).



35 Ácido (S, R) y (S, S)-2-{3-[2-carboxi-1-(3-iodo-fenil)-etil]-ureido}-pentanodioico (23).

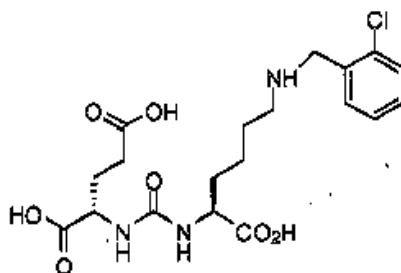
[0043] A una solución de ácido (±)2-{3-[1-(3-iodo-fenil)-2-metoxicarbonil-etil]-ureido}-pentanodioico di-tert-butil éster (289 mg, 0,49 mmol) fue disuelta en metanol (3 mL) y 2M LiOH (0,5 mL) fueron añadidos y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La reacción fue diluida con agua (20 mL) y la capa orgánica fue extraída con acetato de etilo (2 X 20 mL) luego acidificada con 1N HCl a pH ~ 2. La capa acuosa fue extraída con acetato de etilo (3 X 20 mL), secada sobre sulfato de sodio y concentrada para dar el producto bruto (206 mg, 0,36 mmol, 73%) como un sólido blanco. Al material bruto se añadió DCM (2 mL) seguido de TFA (2 mL) y la reacción fue agitada a temperatura ambiente durante toda la noche. Concentración seguida de recristalización a partir de acetato de etilo dio el producto deseado (22 mg, 0,047 mmol, 10%) como un sólido blanco, <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12,39 (br, 3H), 7,64 (br, 1H), 7,56 (m, 1H), 7,30 (bm, 1H), 7,10 (bm, 1H), 6,72 (bm, 1H), 6,34 (bm, 1H), 4,94 (br, 1H), 4,03 (bm, 1H), 2,64 (br, 2H), 2,20 (br, 2H), 1,86 (br, 1H), 1,71 (br, 1H). ESMS *m/z*: 463 (M-H)<sup>+</sup>.



(S, S)-2-{3-[1-carboxi-5-(2-cloro-bencilamino)-pentil]-ureido}-pentanodioico (7) (MIP-1137).

5 [0044] El mismo procedimiento general que se muestra en el esquema 1, usando el ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico di-*t*-butil éster previamente preparado y protegido. El compuesto fue desprotegido utilizando los métodos previamente descritos para dar el producto deseado (100 mg, 45%) como un sólido blanco mate.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,0 (br, 3H), 7,63 (d, 1H), 7,2 (m, 2H), 7,15 (d, 1H), 6,30 (d, 2H), 4,1 (m, 4H), 2,9 (br, 2H), 2,2 (m, 2H), 1,90 (m, 2H), 1,60 (m, 4H), 1,35 (m, 2H). ESMS  $m/z$ : 444 (M+H) $^+$ .

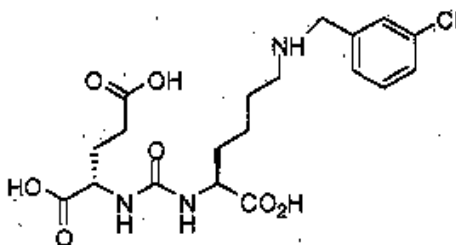
10



(S, S)-2-{3-[1-carboxi-5-(3-cloro-bencilamino)-pentil]-ureido}-pentanodioico (8) (MIP 1131).

15 [0045] El mismo procedimiento general que se muestra en el esquema 1, usando el ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico di-*t*-butil éster previamente preparado y protegido. El compuesto fue desprotegido utilizando los métodos previamente descritos para producir el producto deseado (200 mg, 90%) como un sólido blanco mate.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,9 (br, 3H), 7,6 (s, H), 7,43 (m, 3H), 6,39 (br, 2H), 4,1 (m, 4H), 2,9 (br, 2H), 2,2 (m, 2H), 1,90 (m, 2H), 1,60 (m, 4H), 1,35 (m, 2H). ESMS  $m/z$ : 444 (M+H) $^+$ .

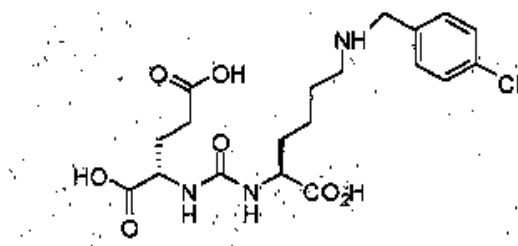
20



(S, S)-2-{3-[1-carboxi-5-(4-cloro-bencilamino)-pentil]-ureido}-pentanodioico (9) (MIP 1135).

25 [0046] El mismo procedimiento general que se muestra en el esquema 1, usando el ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico di-*t*-butil éster previamente preparado y protegido. El compuesto fue desprotegido utilizando los métodos previamente descritos para producir el producto deseado como (10 mg, 66%) como un sólido blanco mate. ESMS  $m/z$ : 444 (M+H) $^+$ .

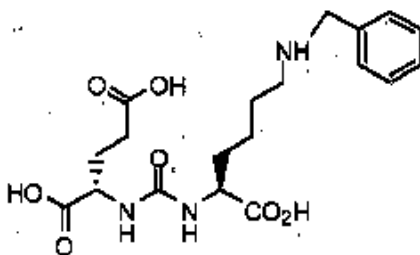
30



Ácido (S)-2-(3-((R)-5-(bencilamino)-1-carboxipentil)ureido)pentanodioico (10). (MIP-1106).

35 [0047] El mismo procedimiento general que se muestra en el esquema 1, usando ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico di-*t*-butil éster el previamente preparado y protegido. El compuesto fue desprotegido utilizando los

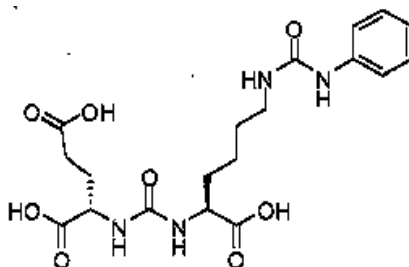
métodos previamente descritos para producir el producto deseado (5 mg, 47%) como un sólido blanco mate. ESMS  $m/z$ : 410 (M+H)<sup>+</sup>.



5 Ácido 2-(3-{1-carboxi-5-[3-(fenil)-ureido]-pentil}-ureido)-pentanodioico (11) (MIP 1111).

[0048] En un matraz de fondo redondo fue disuelto fenil isocianato (100 mg, 0,84 mmol) en DCM (10 mL), ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico di *t*-butil éster (409 mg, 0,84 mmol) fue añadido y agitado durante 3 horas. La mezcla reactiva fue evaporada a seco y la mezcla cruda fue purificada a través de cromatografía flash en columna 2:1 hexanos/etil acetato para proporcionar el éster de *tert*-butilo como un sólido blanco que fue desprotegido usando TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dando el producto deseado. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12,5 (s, 3H), 8,54 (s, 1H), 7,40 (dd, 2H), 7,26 (dd, 2H), 6,30 (t, 2H), 6,17 (t, 1H), 4,05 (m, 2H), 3,05 (m, 2H), 2,44 (m, 2H), 1,90 (m, 1H), 1,68 (m, 2H) 1,52 (m, 1H), 1,40 (m, 2H), 1,29 (m, 2H). ESMS  $m/z$ : 439 (M+H)<sup>+</sup>.

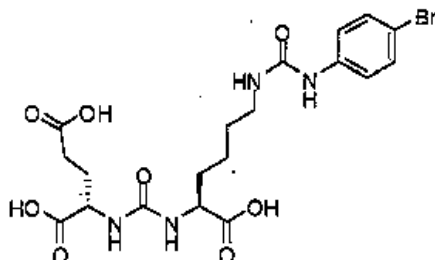
15



Ácido 2-(3-{1-carboxi-5-[3-(4-bromo-fenil)-ureido]-pentil}-ureido)-pentanodioico (12) (MIP 1129)

20 [0049] En un matraz de fondo redondo fue disuelto 4-bromo-fenil isocianato (100 mg, 0,50 mmol) en DCM (10 mL). Ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico di *t*-butil éster (246 mg, 0,50 mmol) fue añadido y agitado durante 3 horas. La mezcla reactiva fue evaporada a seco y la mezcla cruda fue purificada a través de cromatografía flash en columna 2:1 hexanos/etil acetato para dar el *tert*-butil éster como un sólido blanco que fue desprotegido usando TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dando el producto deseado. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12,5 (s, 3H), 8,55 (s, 1H), 7,35 (d, 4H), 6,30 (t, 2H), 6,18 (t, 1H), 4,08 (m, 2H), 3,05 (m, 2H), 2,22 (m, 2H), 1,90 (m, 1H), 1,68 (m, 2H), 1,52 (m, 1H), 1,40 (m, 2H), 1,30 (m, 2H). ESMS  $m/z$ : 518 (M+H)<sup>+</sup>.

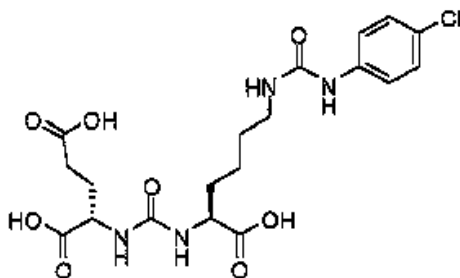
25



30 Ácido 2-(3-{1-carboxi-5-[3-(4-cloro-fenil)-ureido]-pentil}-ureido)-pentanodioico (13) (MIP 1110)

[0050] En un matraz de fondo redondo, fue disuelto 4-cloro-fenil isocianato (100 mg, 0,65 mmol) en DCM (10 mL) ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico, di-*t*-butil éster (318 mg, 0,65 mmol) fue añadido y agitado durante 3 horas. La mezcla reactiva fue evaporada a seco y la mezcla cruda fue purificada a través de cromatografía flash en columna 2:1 hexanos/etil acetato para dar el *tert*-butil éster como un sólido blanco (470 mg, 96%) que fue desprotegido usando TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dando el producto deseado. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12,5 (s, 3H), 8,35 (s, 1H), 7,40 (dd, 2H), 7,19 (dd, 2H), 6,30 (t, 2H), 6,10 (t, 1H), 4,08 (m, 2H), 3,05 (m, 2H), 2,32 (m, 2H), 1,90 (m, 1H), 1,68 (m, 2H), 1,52 (m, 1H), 1,40 (m, 2H), 1,30 (m, 2H). ESMS  $m/z$ : 474 (M+H)<sup>+</sup>.

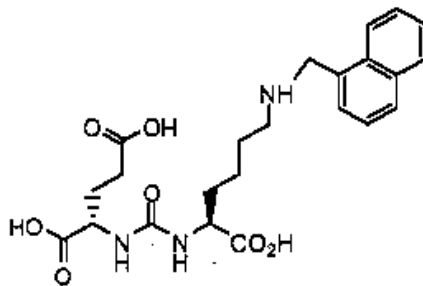
35



Ácido (S)-2-(3-((R)-1-carboxi-5-(25iridino25na-1-ilmetilamino)pentil)ureido)pentanodioico. (14) (MIP-1108).

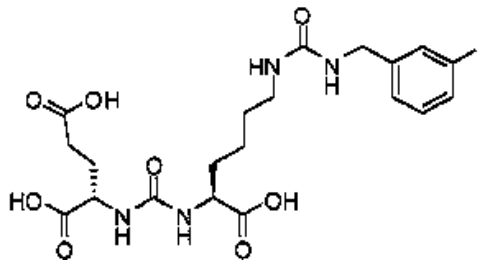
- 5 [0051] El mismo procedimiento general que se muestra en el esquema A, usando el ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico di *t*-butil éster previamente preparado y protegido. El compuesto fue desprotegido utilizando los métodos previamente descritos para producir el producto deseado (51 mg, 70%) como un sólido blanco mate.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,9 (br, 3H), 7,95 (m, 5H), 7,6 (m, 2H), 6,35 (br, 2H), 4,1 (m, 4H), 2,9 (br, 2H), 2,55 (m, 2H), 2,25 (m, 2H), 1,70 (m, 4H), 1,3 (m, 2H). ESMS  $m/z$ : 460 (M+H) $^+$ .

10



Ácido 2-(3-{1-carboxi-5-[3-(3-iodo-bencil)-ureido]-pentil}-ureido)-pentanodioico (15) (MIP-1101).

- 15 [0052] El mismo procedimiento general que se muestra en el esquema 2, usando el ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico di *t*-butil éster previamente preparado y protegido. El compuesto fue desprotegido utilizando los métodos previamente descritos para producir el producto deseado. ESMS  $m/z$ : 579 (M+H) $^+$ .



20

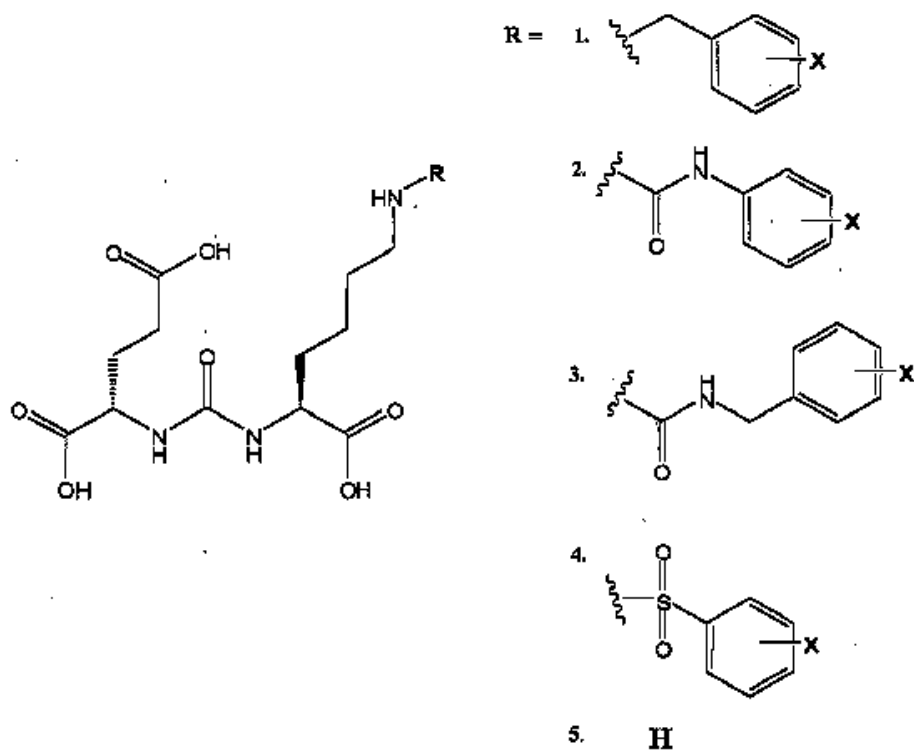
Experimentación general de renio:

- [0053] Los complejos de renio de los inhibidores de SAAC se aíslan convenientemente de las reacciones del precursor fácilmente disponible  $[\text{Net}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$  con el inhibidor de SAAC. Debido a que los conjuntos donantes proporcionados por el terminal SAAC están bien documentados como queladores eficaces para el núcleo  $\{\text{M}(\text{CO})_3\}^{+1}$  y han sido diseñados para adoptar la disposición *facial* requerida acerca del sitio metálico, las preparaciones de los complejos fueron nada excepcionales.

- [0054] El sistema  $\{\text{Re}(\text{I})(\text{CO})_3\}^+$  siguió una reacción química similar a la del núcleo tricarbonyl Tc-99m. El uso de  $[\text{Net}_4]_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$ , como materia prima llevó a la formación superficial del núcleo *fac*- $\{\text{Re}(\text{CO})_3(\text{L})_3\}$ . El  $[\text{Net}_4]_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$  fue fácilmente derivado del  $[\text{ReBr}(\text{CO})_5]$ . La síntesis de los complejos Re(I) fue realizada al reaccionar  $[\text{Net}_4]_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$  con el ligando apropiado TEC en la proporción de 1:1,2 en 10 ml de metanol. La reacción se dejó calentar a 80°C durante 4 horas. Tras el enfriamiento todos los siguientes productos de reacción fueron purificados utilizando una columna de sílice pequeña con rendimientos que variaron de 10-30%.

35





X = I, Br, Cl, F, H

[0055] La tabla 1 inferior es un resumen de inhibidores de PSMA sintetizados investigados.

5

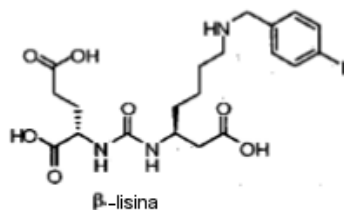
Tabla 1

MIP #	X	Descripción del compuesto	IC <sub>50</sub> (nM)
-	-	PMPA	10
1033	-	Glu-urea-Lys	498
1137	2-Cl	2-Cl-bencil	245
1131	3-Cl	3-Cl-bencil	277
1135	4-Cl	4-Cl-bencil	2
1106	H	Des-halo bencil	2960
1111	H	Des-halo diurea	12
1129	4-Br	4-Br-diurea	2
1110	4-Cl	4-Cl-diurea	4
1108	-	2-nafil	154
1101	3-I	3-I-diurea	10
1027	4-I	4-I-benzoil	3*
1095	4-I	4-I-diurea	10*

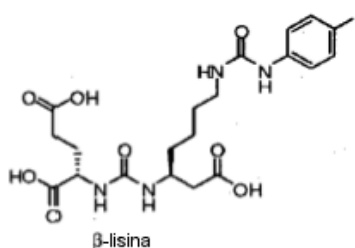
Table 1. Resumen de datos de enlace celular *in vitro* de los derivados de Glu-Urea-Lys adicionales o reevaluados.

[0056] Análogos de β-aminoácido MIP-1072

10



[0057] Análogos de β-aminoácido MIP-1095



5

Síntesis de complejos modelo de núcleo  $\{\text{Re}(\text{CO})_3\}^{+1}$

[0058] Las propiedades de los metales tecnecio y renio del grupo VII son muy similares debido a su relación periódica. Se anticipó que los metales demostrarían una reacción química similar, que es frecuentemente el caso para la química de tricarbonilo, nitrógeno y tiazol de estos dos metales. Asimismo, debido a su tamaño similar que estabiliza la configuración de electrones de espín pareado  $d^6$  de  $M(I)$ , el perrenato y el pertecnetato tienen comportamientos de reacción muy similares. La sintetización de renio-TECs nos permitió una vía superficial para caracterizar estructuralmente los productos. La relación periódica entre Tc y Re indica que radiofármacos Tc-99m se pueden diseñar modelando complejos de renio análogos.

[0059] Algunos de los compuestos nuevos fueron sintetizados con cantidades macroscópicas de renio para la caracterización por métodos convencionales, incluyendo espectrometría de masa, espectrometría de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Tras la purificación, los complejos de renio sintetizados fueron pasados a través de una columna de HPLC para purificación e identificación de tiempos de retención para comparar con productos de reacción Tc. Los complejos renio-TEC fueron también cristalizados.

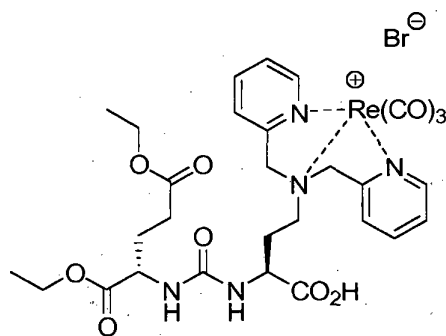
[0060] Los complejos de renio de los inhibidores de SAAC son convenientemente aislados de las reacciones de los precursores fácilmente disponibles  $\{\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3\}^{+1}$  y  $[\text{Net}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$  con el inhibidor de SAAC. Debido a que los grupos donantes establecidos por el terminal SAAC están bien documentados como queladores eficaces para el núcleo  $\{M(\text{CO})_3\}^{+1}$  y han sido diseñados para adoptar la disposición *facial* requerida acerca del sitio metálico, las preparaciones de los complejos fueron comunes.

Experimentación general

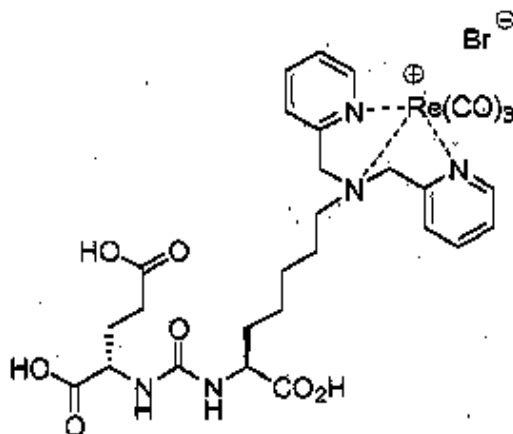
30

[0061] El sistema  $\{\text{Re}(I)(\text{CO})_3\}^+$  tuvo una reacción química similar a la del núcleo tricarbonyl Tc-99m. El uso de  $[\text{Net}_4]_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$ , como materia prima llevó a la formación superficial del núcleo *fac*- $\{\text{Re}(\text{CO})_3(\text{L})_3\}$ . El  $[\text{Net}_4]_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$  fue fácilmente derivado del  $[\text{ReBr}(\text{CO})_5]$ . La síntesis de los complejos  $\text{Re}(I)$  fue realizada al reaccionar  $[\text{Net}_4]_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$  con el ligando TEC apropiado en la proporción de 1:1,2 en 10 ml de metanol. La reacción se dejó calentar a  $80^\circ\text{C}$  durante 4 horas. Tras el enfriamiento todos los siguientes productos de reacción fueron purificados utilizando una columna de sílice pequeña con rendimientos que iban de 10-30%.  $[\text{Re}(\text{CO})_3(2\text{-}\{3\text{-}\{3\text{-}(\text{Bis-piridin-2-ilmetil-amino})\text{-1-carboxi-propil}\}\text{-ureido}\}\text{pentanodietil éster})][\text{Br}]$  (24).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,65 (dd, 2H), 7,85 (dd, 2H), 7,7 (dd, 4H), 7,25 (dd, 2H), 6,42 (dd, 1H), 6,0 (dd, 1H), 4,5 (m, 2H), 4,16 (m, 2H), 3,80 (m, 4H), 2,45 (m, 2H), 2,0 (dd, 2H), 1,5 (m, 4H), 1,25 (m, 6H). ESMS  $m/z$ : 812-815.

40

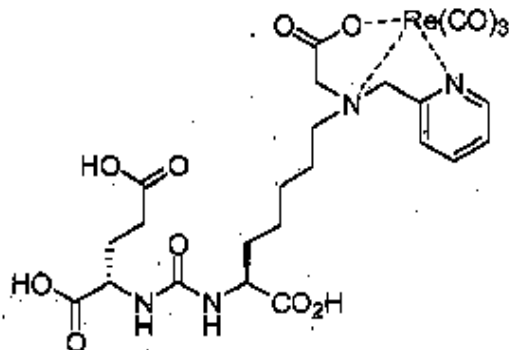


5 Ácido [Re(CO)<sub>3</sub> (2-{3-[5-(Bis-piridin-2-ilmetil-amino)-1-carboxi-pentil]-ureido}-pentanodioico)][Br] (25) (MIP 1029). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12,6 (s, 2H), 8,91 (s, 1H), 8,63 (dd, 2H), 7,85 (dd, 2H), 7,75 (dd, 4H), 7,3 (dd, 2H), 6,44 (d, H), 6,28 (d, 1H), 4,45 (s, 2H), 4,10 (m, 2H), 3,15 (s, 1H), 2,60 (m, 2H), 2,25 (m, 2H), 1,90 (m, 1H), 1,78 (m, 2H), 1,45 (m, 2H). ESMS *m/z*: 770-774.



10 Ácido 2-{3-[1-carboxi-5-(carboximetil-piridin-2-ilmetil-amino)-pentil]-ureido}-pentanodioico (26). El mismo procedimiento general, usando el ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico de *t*-butil éster previamente preparado y protegido. El compuesto fue desprotegido utilizando los métodos previamente descritos (2,2 mg, 65%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,65 (d, 1H), 7,91 (dd, 1H), 7,56 (d, 1H), 7,45 (dd, 1H), 6,31 (m, 2H), 4,34 (s, 2H), 4,08 (m, 4H), 3,10 (m, 2H), 2,24 (m, 2H), 1,95 (m, 1H), 1,68 (m, 4H), 1,5 (m, 1H), 1,22 (m, 2H). ESMS *m/z*: 469 (M+H)<sup>+</sup>. M+1 469.

15 Ácido [Re(CO)<sub>3</sub>(2-{3-[1-carboxi-5-(carboximetil-piridin-2-ilmetil-amino)-pentil]-ureido}-pentanodioico)] (27). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,75 (d, 1H), 8,13 (dd, 1H), 7,69 (d, 1H), 7,57 (dd, 1H), 6,45 (m, 2H), 4,75 (m, 1H), 4,50 (m, 1H), 4,20 (m, 2H), 3,61 (m, 4H), 3,15 (m, 2H), 2,38 (m, 1H), 2,0 (m, 2H), 1,75 (m, 4H), 1,62 (m, 1H), 1,25 (m, 2H). ESMS *m/z* 779-782 (M+2Na)<sup>+</sup>.



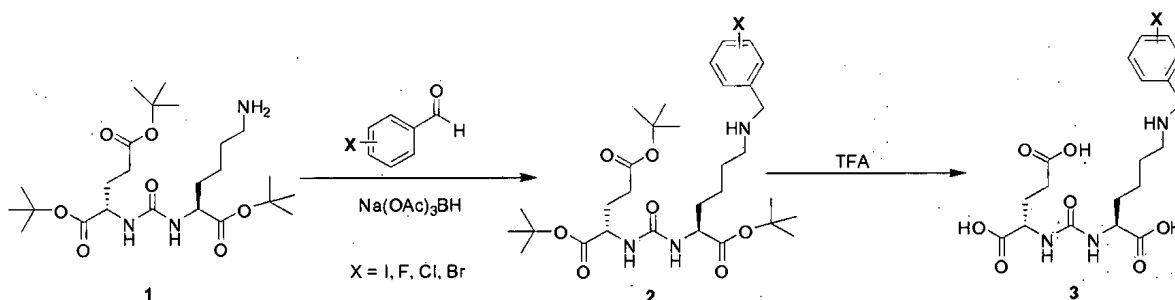
20

Síntesis de análogos de Glu-Urea-Lys(*N*-bencil-*X*) (3).

25

[0062] Los compuestos de la estructura general 3 fueron preparados en rendimientos totales que varían de 20-40% utilizando la vía general representada en el esquema A. El intermedio sintético clave (1) fue reaccionado con el aldehído apropiado a temperatura ambiente durante una hora para formar la base de piridina intermedia. La base de piridina no se aisló pero fue reducida *in situ* con triacetoxiborohidruro de sodio. Los grupos protectores de *t*-butil éster fueron eliminados usando 50% de TFA en DCM durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la finalización de la

desprotección, las reacciones fueron concentradas en un evaporador giratorio y purificadas por HPLC o cromatografía en columna rápida para dar los productos deseados (3) en 40-80 % de rendimiento.



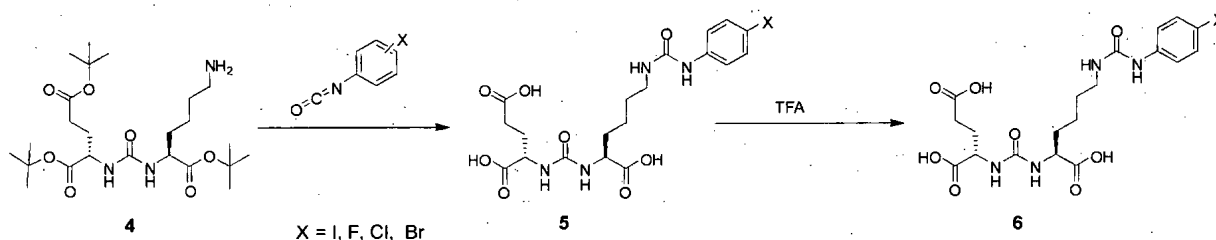
5

Esquema A. Vía general para la síntesis de análogos de Glu-Urea-Lys(N-bencil-X) halogenados (3).

Síntesis de análogos de Glu-Urea-Ureido(Fenil-X)

10 [0063] Los siguientes compuestos de la estructura general 8 fueron preparados en rendimientos totales que varían de 20-60% por la vía representada en el esquema B. El intermedio sintético clave (4) fue reaccionado con el fenilisocianato apropiado a temperatura ambiente para dar los productos intermedios protegidos deseados (5) en rendimientos buenos. Los grupos protectores de *t*-butil éster fueron eliminados en presencia de 50% de TFA en DCM durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la finalización, las reacciones fueron concentradas en un evaporador giratorio purificado por HPLC o recristalización para dar los productos deseados (6) en 40-90% de rendimiento.

15



20

Esquema B. Vía general para la síntesis de análogos de Glu-Urea-Ureido(Fenil-X) halogenados.

Preparación y caracterización del marcaje de Tecnecio-99m de complejos radiomarcados

25 [0064] La preparación de los complejos marcados con <sup>99m</sup>Tc se consiguió por adición de 100μL de una solución con [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> a 500μL de 10<sup>-4</sup> M soluciones del inhibidor-SAAC. Las mezclas fueron calentadas a 70°C durante 30 min. Los productos fueron analizados para su pureza radioquímica por HPLC de fase inversa.

30 [0065] La estabilidad de los compuestos radiomarcados en la solución y en el suero fueron determinados como función de tiempo y condiciones de solución. Específicamente, después del radiomarcaje y aislamiento, el producto fue almacenado a temperatura ambiente durante 6 h después de lo cual se realizó análisis por HPLC para controlar el grado de retención de marcador, al igual que la degradación de producto potencial. La reforma de TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> y la presencia del material reducido TcO<sub>2</sub> fue analizada.

35 [0066] Para ayudar en la predicción de la estabilidad *in vivo*, se realizaron inoculaciones de ligandos. Específicamente, las estabildades de los complejos <sup>99m</sup>Tc fueron investigadas por incubación de los complejos purificados por HPLC en 5% de suero de ratón a temperatura ambiente y 37°C. La capacidad de competencia de ligandos, tal como cisteína y DTPA, para extraer Tc-99m de los complejos fue estudiada por incubación de los complejos purificados con soluciones (PBS pH 7,2) que contenían ligandos competentes a concentraciones finales de 0,1 M.

40 [0067] Los resultados de los estudios de competencia de marcaje no demostraron ninguna degradación de los complejos Tc-99m en 6 horas en el suero o el estudio de ligandos de competencia. Los resultados de la incubación a 37°C después de 6 horas se muestran en la figura 2.

Yodaciones de DCT

45 [0068] Preparación del compuesto marcado con yodina-131 N-[N-[(S)-1,3-dicarboxipropil]carbamoil]-S-3-yodo-L-tirosina (I-131-DCIT) se consiguió por adición de 100ul de [I-131] NaI en 0,1 N NaOH a una solución de PBS (pH 7,2) que

contenía DCT (1mg / mL) en un tubo Iodogen™ (Fisher Scientific, Pierce). La mezcla fue agitada en vórtex durante 3 minutos y almacenada a temperatura ambiente durante 20 minutos.

[0069] La estabilidad del compuesto radiomarcado en la solución fue determinada como función de tiempo. Específicamente, después del radiomarcaje y aislamiento, el producto fue almacenado a temperatura ambiente durante 48 h después de lo cual se realizó análisis de HPLC para revisar en busca del grado de retención de marcador, al igual que la degradación de producto potencial. La reforma de NaI y la presencia de los yodatos reducidos fue analizada. Los resultados del estudio de estabilidad de marcaje no demostraron ninguna degradación significativa del I-131 DCIT en 2 días a temperatura ambiente. Los resultados del estudio se muestran en la figura 3.

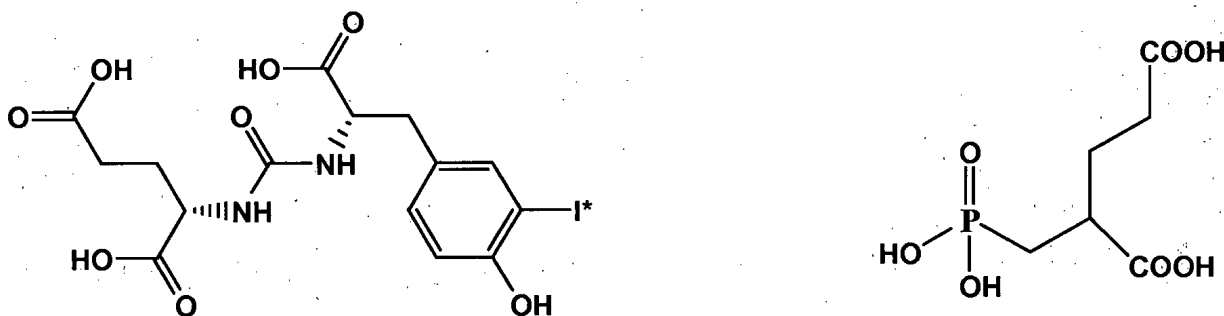
[0070] La preparación del compuesto marcado con yodina-131 ácido 2-{3-[1-carboxi-5-(4-iodo benzoilamino)-pentil]-ureido}-pentanodioico (I-131-MIP 1072) se consiguió por adición de 100ul de [I-131] NaI en 0,1 N NaOH con 30 µl metanol con 0,5% ácido acético a una solución de PBS (pH 7,2) que contenía MIP 1072 (1mg / mL) en un tubo IODOGEN (Fisher Scientific). La mezcla fue agitada en vórtex durante 3 minutos y almacenada a temperatura ambiente durante 20 minutos.

[0071] La estabilidad del compuesto radiomarcado en la solución fue determinada como función de tiempo. Específicamente, después del radiomarcaje y aislamiento, el producto fue almacenado a 37 °C durante 3 días después de los cuales se realizó análisis de HPLC para controlar el grado de retención de marcador, al igual que la degradación de producto potencial. La reforma de NaI y la presencia de los yodatos reducidos fue analizada. Los resultados del estudio de estabilidad de marcaje no demostró ninguna degradación significativa del I-131 1072 en 3 días a temperatura ambiente en DMSO, 10% etanol / solución salina, PBS a pH 7,2, y 6% de ascorbato / 3% solución ácida genticica. Los resultados del estudio se muestran en la figura 4.

#### 25 Caracterización biológica de conjugados SAAC-Urea-Glutamato

[0072] Los conjugados SAAC-Urea-Glu recién preparados fueron seleccionados en un ensayo de enlace celular de cáncer de próstata humana, utilizando células LNCaP positivas en PSMA y células PC3 negativas en PSMA. Los compuestos que demostraron absorción específica o enlace a células positivas de PSMA serán estudiados para localización tumoral *in vivo*.

[0073] Ensayos de selección en frío *in vitro* frente a I-131 DCIT. Las células LNCaP y PC3 cancerosas de próstata humana fueron obtenidas de la American Type Culture Collection, Rockville, MD. Las células LNCaP se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero de bovino fetal (FBS). Las células PC3 se cultivaron en medio F12K suplementado con 10% de FBS. La unión del compuesto radiomarcado y la competencia con derivados fríos para las células LNCaP y PC-3 fue realizada según los métodos de Tang *et al.* (Tang, H.; Brown, M.; Ye, Y.; Huang, G.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Zhai, H.; Chen, X.; Shen, T.Y.; Tenniswood, M., Prostate targeting ligands based on N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003, 307, 8-14) con modificaciones apropiadas. Se colocaron células en placas de 12 pocillos a aproximadamente  $4 \times 10^5$  células/pocillo y se incubaron durante 48 horas en una incubadora humedecida a 37 °C/5% de dióxido de carbono antes de añadir el compuesto. Cada único conjugado de SAAC-urea-Glu se preparó y diluyó en el medio de cultivo celular sin suero con 0,5% de albúmina de suero bovino (BSA) en combinación con 3nM I-131 DCIT (inhibidor conocido). La unión total fue determinado por incubación de I-131 DCIT sin compuesto de prueba. Se incubaron placas a temperatura ambiente durante 1 hora. Las células fueron quitadas de las placas suavemente con pipeta y transferidas a tubos Eppendorff. Se microcentrifugaron muestras durante 15 segundos a 10K x g. El medio fue aspirado y el granulado fue lavado dos veces por dispersión en el medio de ensayo fresco seguido de microcentrifugado. La unión celular de I-131 DCIT fue determinada por recuento del granulado celular en un gammámetro automatizado. La unión no específica fue determinada como los recuentos asociados a las células después de la incubación con 2 µM de compuesto no radiomarcado o ácido 2-fosfonometil-pentanodioico (PMPA). Los compuestos de control se representan más abajo.



Compuestos de control

[0074] Los dos compuestos clave para los ensayos de enlace se muestran arriba: el I-DCIT (Kozikowski *et al*) y ácido 2-fosfonometil-pentanodioico (PMPA-derecha), un inhibidor potente con  $IC_{50} = 6$  nM.

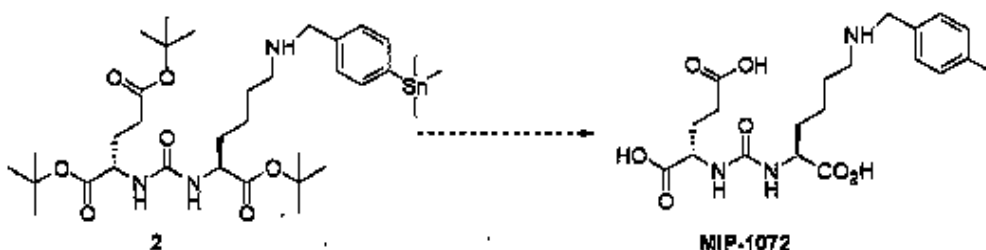
5 [0075] (ii) Selección de dosis *in vitro*. I-131 DCIT enlazado específicamente a células LNCaP y no a células PC3 como es evidente por las cuentas desplazables por compuesto no radiomarcado o PMPA sólo en células LNCaP (figura 5). Las constantes de enlace fueron determinadas por incubación de células LNCaP con varias cantidades de DCIT no radiomarcado en presencia de una cantidad constante de I-131 DCIT y división por la actividad específica de cada solución para determinar el número de fmoles de compuesto enlazado (figura 6). El  $K_d$  fue determinado para ser 264 nM y  $B_{max}$  fue 254 fmoles. Compuesto MIP-1033 que a 2  $\mu$ M compitió con I-131 DCIT para la unión a células LNCaP, fue reevaluado a varias dosis para determinar valores  $IC_{50}$  (figuras 7 y 8). Mientras MIP-1072, MIP-1095 y MIP-1097 mostraron valores  $IC_{50} < 50$  nm el compuesto MIP-1033 mostró un  $IC_{50}$  497 nM. El compuesto MIP-1029 no compitió para unión (tabla 1).

15 [0076] Para confirmar los resultados del análisis de Scatchard de la figura 7 que indica internalización de MIP-1072 en células LNCaP, el índice de absorción de MIP-1072 en células LNCaP fue monitorizado. Cada pocillo se dosificó con 100 nM MIP-1072 (2 uCi/pocillo) a 4 °C y 37 °C. El enlace a PSMA alcanzó el equilibrio después de 15 min como se demostró por la meseta de la curva a 4 °C. Las células incubadas a 37 °C siguieron interiorizando MIP-1072 después de que se alcanzara el equilibrio. Este resultado, figura 10, confirma el Scatchard e indica que MIP-1072 es de hecho interiorizado.

20 [0077] (iii) Experimentación de ensayo de microsoma  
Microsomos de hígado de rata macho agrupados (1 mg/mL, BD Biosciences), sistema NADPH de regeneración (1,3 mM NADP, 3,3 mM glucosa 6-fosfato y 0,4 U/mL glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, BD Biosciences) y compuesto de prueba (50  $\mu$ M MIP-1072, 50  $\mu$ M DCT, y 100  $\mu$ M Phenacetin) fueron añadidos a 0,1 M tampón de fosfato potásico (pH 7,4) para controlar la degradación catastrófica de los compuestos de prueba. La mezcla fue incubada a 37°C y en el tiempo indicado (0, 15, 60 min) la reacción fue detenida por la adición de un volumen igual de metanol helado (500  $\mu$ L). El lodo resultante fue luego centrifugado a 21,000xG durante 10 min y el sobrenadante fue recogido e inyectado sobre un modelo LCMS de Agilent MSD SL utilizando un gradiente 95:5 agua:acetonitrilo (con 0,1% de ácido fórmico) a 40:60 agua:acetonitrilo (con 0,1% de ácido fórmico) y controlando el ión original solo en el modo de ión único. Los resultados, mostrados en las figuras 11A y 11B, se expresan como degradación del ión original con respecto al punto 0 min.

25 [0078] La estabilidad de MIP-1072 fue evaluada utilizando microsomas de hígado de rata. MIP-1072 (50  $\mu$ M) y Phenacetin (100  $\mu$ M) fueron incubados con microsomas de hígado de rata a 37°C durante el tiempo indicado. Phenacetin fue usado como una sustancia de control conocida por ser metabolizada. MIP-1072 no fue degradado por los microsomas de hígado de rata durante el periodo de incubación. No obstante, Phenacetin fue degradado por 22% después de una incubación de 60 min.

30 [0079] El compuesto principal, MIP 1072, fue I-131-marcado para estudios de distribución de tejido en ratones con ambos tumores LNCaP (positivo en PSMA) y PC3 (negativo en PSMA) implantados. El compuesto fue radiomarcado por la vía mostrada más abajo.



35 [0080] Los resultados de biodistribución de tejido, fueron consistentes con los datos *in vitro*, y demostraron absorción significativa en los tumores LNCaP (PSMA positivos). Los resultados también mostraron un grado alto de especificidad con muy poca actividad en los tumores PC3 (PSMA negativos). Un gráfico que describe la distribución de ratones se muestra debajo (figura 12).

40 [0081] La evaluación biológica que utiliza N-[N-[(S)-1,3-dicarboxipropil]carbamoil]-S-3-iodo-L tirosina (I-131-DCIT) frente a complejos "fríos" demostró ser una primera selección rápida, seguido de curvas de dosis para determinar valores precisos de  $IC_{50}$ . La serie principal de compuestos que mostró valores de  $IC_{50} < 50$ nM. Datos *in vivo* de la serie principal demostraron alta afinidad, con 3% ID/g acumulando en los tumores LNCaP, y especificidad alta con la proporción LNCaP -a-PC3 superior a 15-a-1.

45 Protocolo de lisis de célula LNCaP

50 2 matraces T75 confluentes

Lavado células fuera de la placa por pipeta arriba y abajo con medios.

Lavado con 0,32 M sacarosa, recentrifugado

Resuspendido de granulado celular en 1 mL 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,5% Tritón X-100

Centrifugado a 14.000 r.p.m. durante 1 min para precipitar núcleos  
 Eliminación sobrenadante y división en 50 µL partes alícuotas  
 Depósito a -80C

5 Ensayo de proteína:

[0082] Estándar de proteína Bio-Rad II-1,44 mg/ml

10 [0083] Dado que se usa detergente en el paso de lisis, activar el reactivo, A' añadiendo 20 µL de reactivo S a cada 1 mL de reactivo de A será necesario para la ejecución. (Si se forma un precipitado, calentar y agitar en vórtex)  
 Preparar 5 diluciones de proteína - 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 mg/mL  
 También preparar 1/10, 1/100 y 1/1000 diluciones de la desconocida  
 Combinación 25 µL estándar/desconocido, 100 µL A', 800 µL reactivo B por duplicado. Mezcla después ~15 min  
 absorbancia de medida a 750 nM

15

Ensayo NAALADasa:

[0084]

20 Tampón Rxn: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 20 mM CoCl<sub>2</sub>, 32 mM NaCl  
 Enfriar NAAG (100 mM materia prima) diluido 1/100 en tampón Rxn durante 1 mM  
 Combinar 600 µL tampón y lisato de célula LNCaP (200 µg) Pre-incubar a 37°C durante 3 min Pre-incubar tampón  
 Rxn y lisato de célula LNCaP durante 3 min a 37°C  
 25 Añadir 6 µL de 1 mM NAAG (durante 1 µM concentración final) enriquecido con 1.000.000 CPM de <sup>3</sup>H-NAAG (100 µL de 1 mM NAAG + 10µL de 3H-NAAG (10 µCi)). Para competición añadir PMPA.  
 Incubar durante 30 min  
 En el tiempo indicado, parar la reacción eliminando 100 µL de la mezcla de reacción y añadir un volumen igual de  
 0,25 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> muy frío, pH 4,3 para parar el rxn  
 30 Aplicar ½ de mezcla a 250 mg columna de intercambio de cationes AG 50W-X4 (200-400 malla, H<sup>+</sup> forma, hinchar resina con DI H<sub>2</sub>O antes de usar). Guardar la otra ½ para recuento.  
 Lavar columna con 500 µL 1:1 Rxn Tampón/0,25M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 Eluir con 3M KCl (1,5 mL)  
 Recuento 100 µL de la carga, elución y reacción (diluido 1:6) para minimizar enfriamiento rápido NOTAS:  
 Tiempo = 0 valores de control se sustraerán de puntos de tiempo experimentales  
 35 Resultados expresados como proteína de pmol <sup>3</sup>H-glutamato formada/min/mg  
 Grant dice solo 10 min para asegurar linealidad, aunque Luthi-Carter, *et al* (J. Pharm. Exp.Therap. 1998 286(2))  
 dice que 2 horas aún no tienen ningún efecto en la linealidad y menos del 20% del sustrato consumido  
 Tratamientos terapéuticos

40 [0085] Compuestos de la presente pueden utilizarse para inhibir NAALADasa para tratamientos terapéuticos.  
 Enfermedades que podrían ser receptivas al tratamiento de NAALADasa incluyen neuropatía diabética dolorosa y  
 sensorial, daño neuronal y cáncer de próstata, esquizofrenia, cáncer colorrectal, inflamación, esclerosis lateral  
 amiotrófica o neuropatía diabética. Los presentes compuestos también pueden usarse como analgésico. Guía para el  
 modelaje de tales tratamientos terapéuticos se puede encontrar en Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of  
 45 Therapeutics, McGraw Hill, 10 edition, 2001, Pharmaceutical Preformulation and Formulation: A Practical Guide from  
 Candidate Drug Selection to Commercial Dosage Form, CRC, 2001 y Handbook of Pharmaceutical Excipients, AphA  
 Publications, 5 edition, 2005.

Unión competitiva de análogos (figura 16)

50

[0086] La capacidad de análogos no radioactivos para competir con <sup>131</sup>I-DCIT para la unión a PSMA fue evaluada en  
 células LNCaP de la línea celular de cáncer de próstata humana positiva en PSMA. Las células LNCaP (300,000  
 células/pocillo) fueron incubadas durante 1 hora con 3 nM [<sup>131</sup>I]-DCIT en presencia de 1-10.000 nM MIP-1072 en medio  
 55 RPMI-1640 suplementado con 0,5% de albúmina de suero bovino, luego lavadas y contadas en un gammámetro. Todos  
 los documentos citados en esta especificación que incluyen solicitudes de patente se incorporan por referencia en su  
 integridad.

Unión directa e internalización de MIP-1072

60 [0087] La unión directa de <sup>123</sup>I-MIP-1072 a células de cáncer de próstata fue examinada (figura 17). Las células LNCaP ,  
 o las células PC3 de la línea celular negativa de PSMA, fueron incubadas en el medio RPMI-1640 suplementado con  
 0,5% de albúmina de suero bovino durante 1 hora con 3 nM <sup>123</sup>I-MIP-1072 solo, o en presencia de 10 µM de MIP-1072  
 no marcado, o 10 µM ácido 2-(fosfonometil)-pentanodioico (PMPA), un inhibidor de NAALADasa estructuralmente no  
 65 relacionado. Las células fueron lavadas y contadas en un gammámetro.

[0088] La constante de afinidad ( $K_d$ ) de MIP-1072 fue determinada por análisis de unión de saturación (figura 18). Las células LNCaP fueron incubadas durante 1 hora con 30-100.000 pM  $^{125}\text{I}$ -MIP-1072 en HBS (50 mM Hepes, pH 7,5, 0,9% de cloruro sódico) a 4°C o 37 °C en ausencia o presencia de 10  $\mu\text{M}$  de MIP-1072 no marcado (para determinar unión no específica). Las células fueron luego lavadas y la cantidad de radioactividad fue medida en un gammámetro. El enlace específico fue calculado como la diferencia entre unión total y unión no específica. La constante de afinidad ( $K_d$ ) de la interacción de MIP-1072 con PSMA en células LNCaP fue determinada por análisis de unión de saturación realizado por valoración de  $^{125}\text{I}$ -MIP-1072 (3 pM - 1.000 nM) en presencia y ausencia de un exceso de MIP-1072 (10  $\mu\text{M}$ ) no radiomarcado. Un  $K_d$  de 4,8 nM, y  $B_{\text{max}}$  de 1,490 fmoles/ $10^6$  células a 4°C fue determinado por análisis de regresión no lineal utilizando el programa Graph Pad Prism (figura 18). El  $K_d$  no fue significativamente diferente a 37°C, 8,1 nM. El  $B_{\text{max}}$ , no obstante, fue superior a 37°C que a 4°C; 1.490 vs. 4.400 fmol/ $10^6$  células, respectivamente, indicando internalización de MIP-1072. Los resultados más abajo son representativos de dos análisis independientes.

[0089] La capacidad de MIP-1072 para interiorizar en células LNCaP fue confirmada por un ensayo de lavado ácido (figura 19). Las células LNCaP fueron incubadas en HBS con 100 nM  $^{125}\text{I}$ -MIP-1072 durante 0-2 horas a 4 y 37°C. En el tiempo indicado los medios fueron eliminados y las células fueron incubadas en el tampón ácido moderado (50 mM de glicina, 150 mM de NaCl, pH 3,0) a 4°C durante 5 minutos. Después de la breve incubación las células fueron centrifugadas a 20.000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante y el granulado celular fueron contados en un gammámetro. Para confirmar los resultados del análisis de unión de saturación que indican internalización de MIP-1072 en células LNCaP, monitorizamos el índice de absorción de MIP-1072 en células LNCaP. Cada pocillo fue dosificado con 100 nM de MIP-1072 (2 uCi/pocillo) a 4°C y 37 °C. La unión a PSMA alcanzó el equilibrio después de 15 min como se ve por la meseta en la curva a 4 °C. Las células incubadas a 37°C continúan interiorizando MIP-1072 después de que se haya alcanzado el equilibrio. Los resultados muestran un aumento insensible al ácido en función del tiempo en la radioactividad asociada al granulado a 37°C pero no a 4°C, lo que indica que  $^{125}\text{I}$ -MIP-1072 se interioriza a 37°C pero no a 4°C (figura 19).

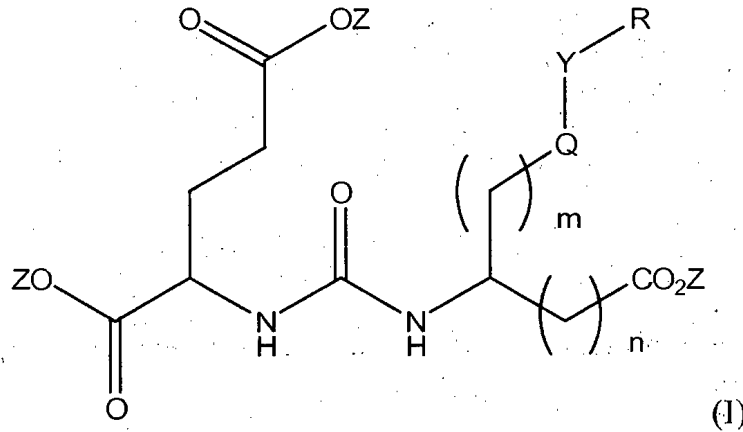
Absorción tumoral y distribución de tejido de  $^{125}\text{I}$ -MIP-1072

[0090] Un análisis cuantitativo de la distribución de tejido de  $^{125}\text{I}$ -MIP-1072 fue realizado en grupos separados de ratones macho NCr lampiños<sup>-/-</sup> portadores de xenotransplantes LNCaP positivos en PSMA (aproximadamente 100-200  $\text{mm}^3$ ) administrado a través de la vena de la cola como una inyección en bolo (aproximadamente 2  $\mu\text{Ci}$ /ratón) en un volumen constante de 0,05 ml. Los animales (n=5/punto de tiempo) fueron eutanasiados por asfixia con dióxido de carbono a 0,25, 1, 2, 4, 8 y 24 horas tras la inyección. Los tejidos (sangre, corazón, pulmones, hígado, bazo, riñones, glándulas suprarrenales, estómago, intestinos grueso y delgado (con contenido), testículos, músculo esquelético, hueso, cerebro, tejido adiposo y tumor) fueron seccionados, cortados, pesados en húmedo, transferidos a tubos plásticos y contados en un  $\gamma$ -contador automatizado (LKB Modelo 1282, Wallac Oy, Finlandia). Para comparar la absorción de  $^{125}\text{I}$ -MIP-1072 en LNCaP contra tumores PC3, y para demostrar que el compuesto estaba en el mecanismo a través de competición con ácido 2-(fosfonometil)-pentanodioico (PMPA), algunos ratones que portaban xenotransplantes LNCaP o PC3 fueron pretratados con 50 mg/kg de PMPA 5 minutos antes de la inyección con  $^{125}\text{I}$ -MIP-1072 y tejidos seleccionados fueron cosechados a 1 hora después de la inyección. La mayor absorción y exposición de MIP-1072 fue en el riñón y el xenoinjerto LNCaP que expresaba altos niveles de PSMA. La absorción de valor máximo en el riñón fue  $158 \pm 46$  %ID/g a 2 horas y el xenoinjerto LNCaP fue  $17 \pm 6$  %ID/g a 1 hora (figura 20). La absorción en estos tejidos diana fue rápida, mientras que el lavado fue más lento en el xenoinjerto LNCaP.  $^{125}\text{I}$ -MIP-1072 demostró estar en el mecanismo *in vivo* como se evidenció por la localización de tumores LNCaP que expresan PSMA pero no para tumores PC3 que no expresan PSMA (figura 21). Además, tanto el tumor como los riñones fueron bloqueados por pretratamiento de los ratones con PMPA, un inhibidor potente de PSMA.



REIVINDICACIONES

1. Compuesto según la fórmula (I):



5 donde:

R es un arilo sustituido o no sustituido en C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, un heteroarilo sustituido o no sustituido, un alquilo sustituido o no sustituido en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> o -NR'R';

Q es C(O), O, NR', S(O)<sub>2</sub> o C(O)<sub>2</sub>;

10 Y es C(O), O, NR', S(O)<sub>2</sub>, C(O)<sub>2</sub>, o (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>;

Z es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>;

m es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

n es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

p es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

15 R' es independientemente H, un arilo sustituido o no sustituido en C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, un heteroarilo sustituido o no sustituido o un alquilo sustituido o no sustituido en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cuando se sustituyen, el arilo, heteroarilo y alquilo se sustituyen con halógeno, heteroarilo, -NR'R' o COOZ;

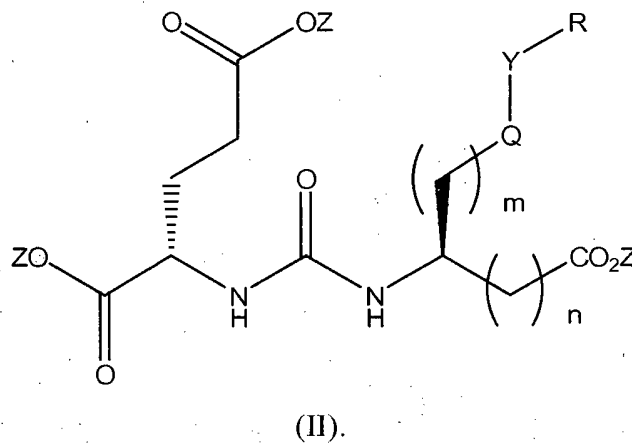
además donde (i) al menos uno de R o R' es un arilo en C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> o un heteroarilo sustituido con un halógeno, o (ii) al menos uno de R o R' es un heteroarilo;

20 donde el heteroarilo es un heteroarilo en C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, furanilo, tienilo, pirrolilo o imidazolilo,

y donde el heteroarilo en C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> es un grupo arilo que tiene de 1 a 3 heteroátomos como átomos de anillo, el resto de los átomos de anillo son átomos de carbono; o una sal derivada farmacéuticamente aceptable.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde el compuesto es un compuesto según fórmula (II):

25



3. Compuesto según la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde el halógeno es un radiohalógeno.

30 4. Compuesto según la reivindicación 3, donde el radiohalógeno es I-123, I-125, I-131, I-124, Br-75, Br-77 o F-18.

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde:

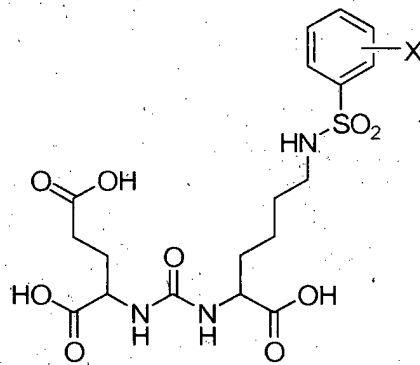
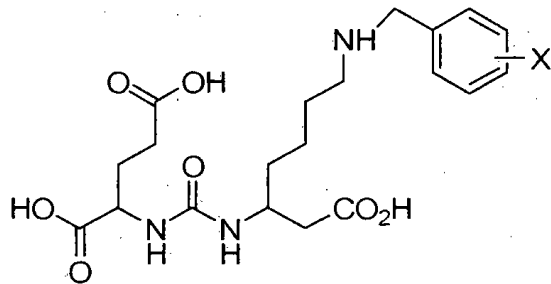
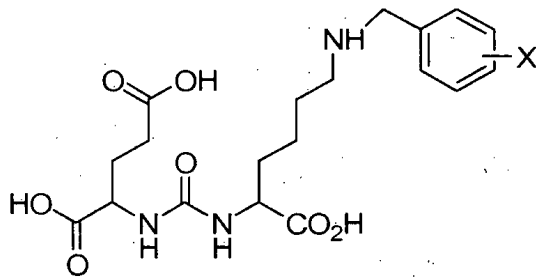
n es 0 o 1;  
 m es 0, 1, 2, 3 o 4;  
 Q es NR';  
 Y es C(O) o CH<sub>2</sub>; y  
 R es un arilo sustituido o no sustituido en C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>.

5

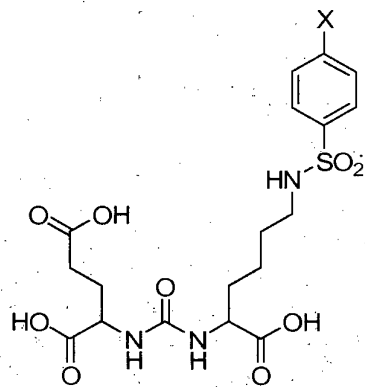
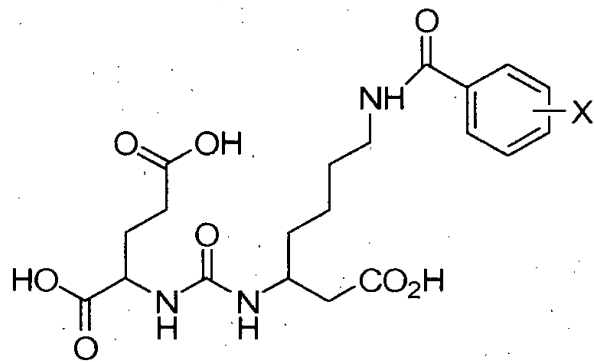
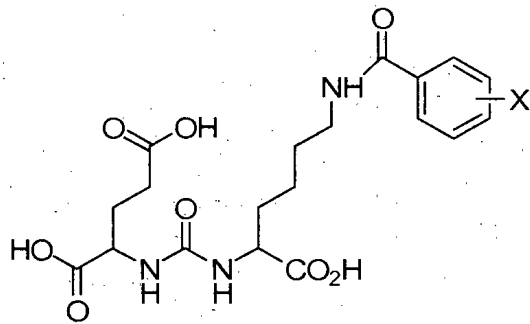
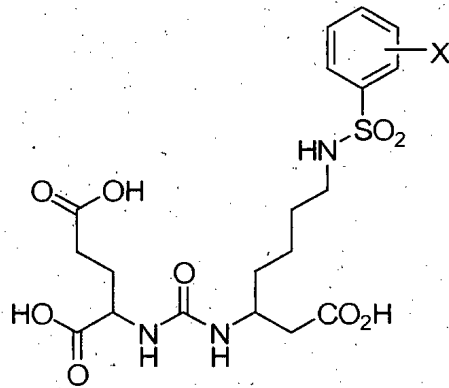
6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde R es una fracción de fenilo sustituida con un halógeno.

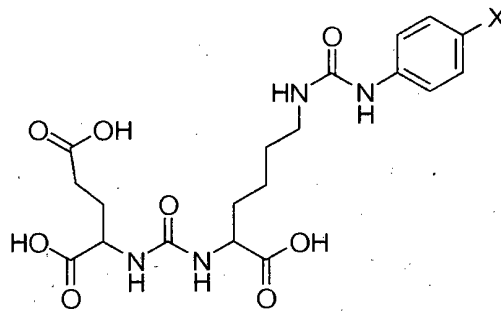
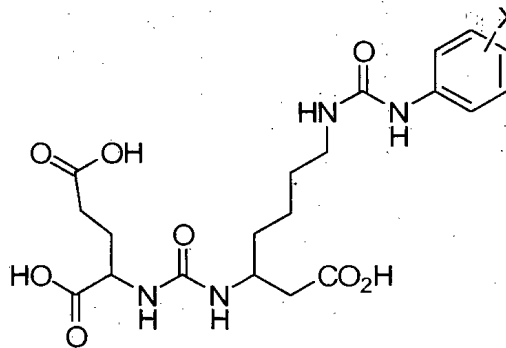
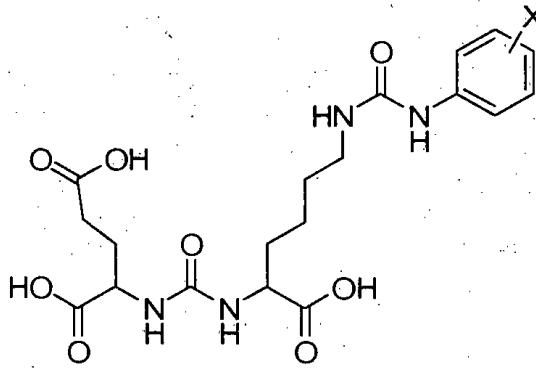
10

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el compuesto es:



15





o

5

donde los grupos carboxi de cualquiera de los compuestos anteriores se puede sustituir con un alquilo en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, y X se selecciona del grupo que consiste en halógeno, radiohalógeno, I-123, I-125, I-131, I-124, Br-75, Br-77 y F-18.

10 8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde:

n es 0 o 1;

m es 0, 1, 2, 3 o 4;

Q es NR';

15

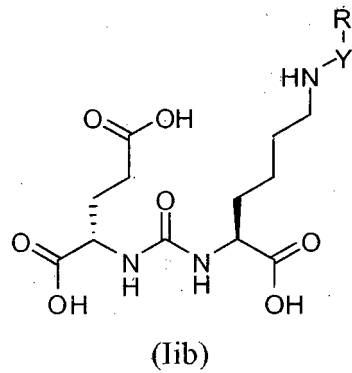
Y es C(O) o CH<sub>2</sub>;

R es un -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>1-4</sub>CHNR'R'; y

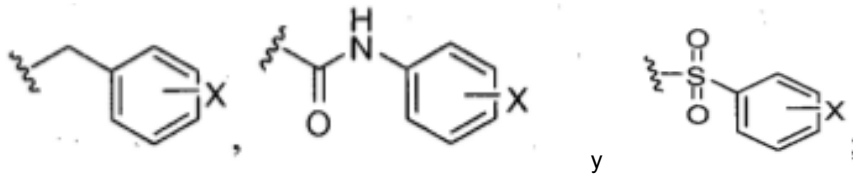
R' es independientemente un alquilo en C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> sustituido con una piridina o grupo carboxi.

20

9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el compuesto es un compuesto según la fórmula (lib):



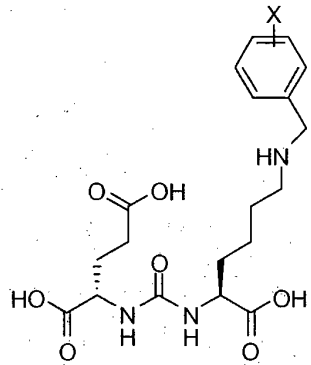
donde -Y-R se selecciona del grupo que consiste en:



5

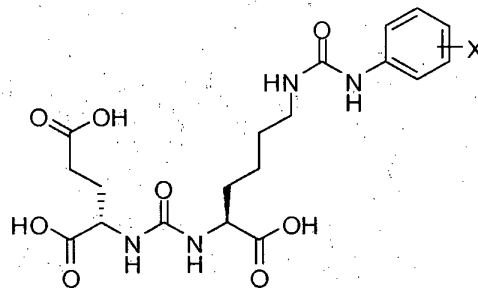
y H; y donde X se selecciona del grupo que consiste en: I, Br, Cl, F y H.

10. Compuesto de la reivindicación 9, donde el compuesto tiene la estructura:



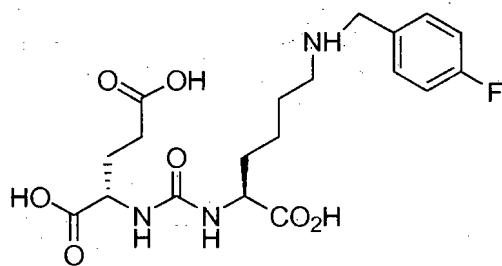
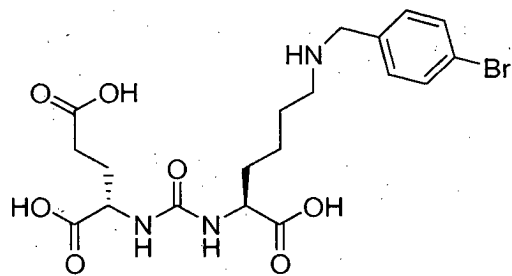
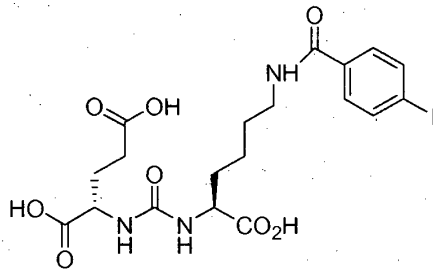
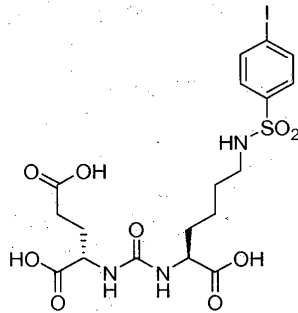
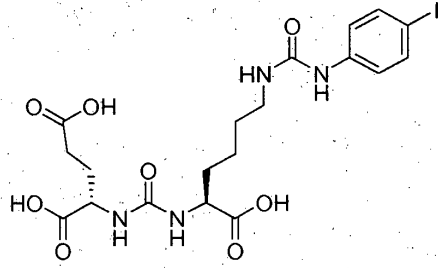
10

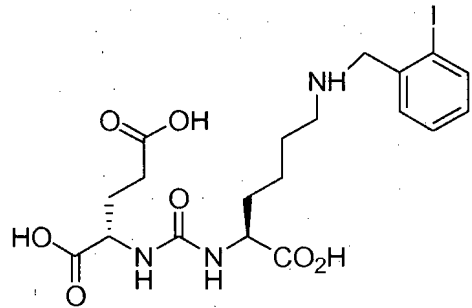
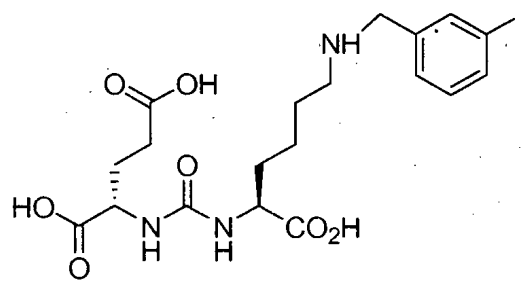
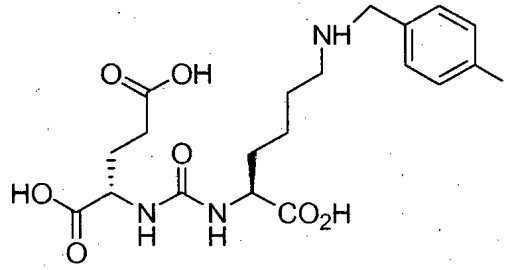
o

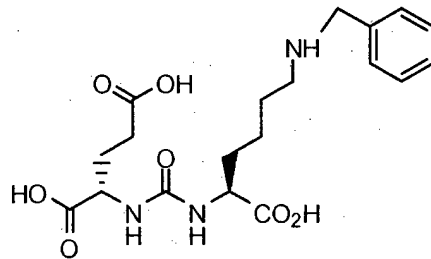
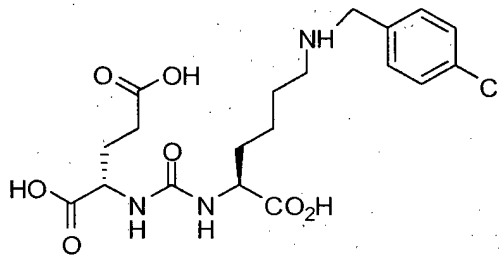
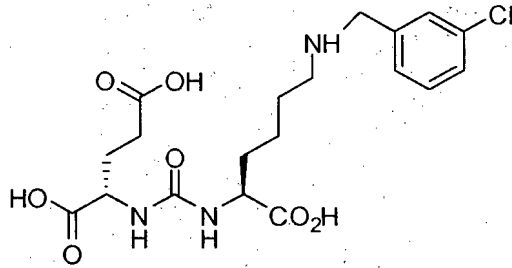
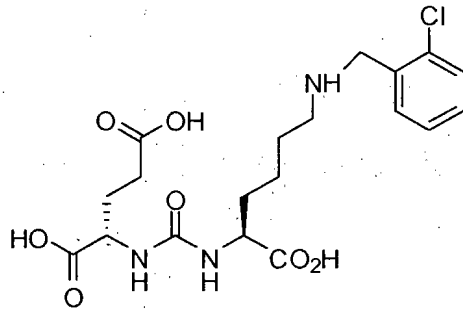


15

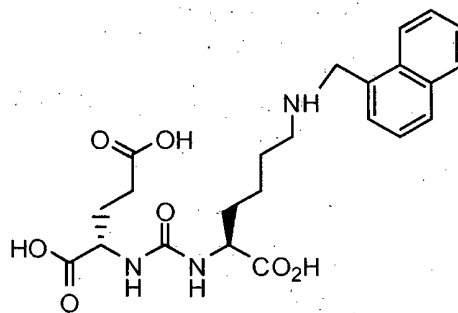
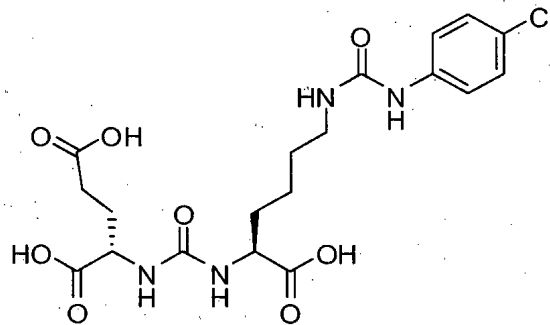
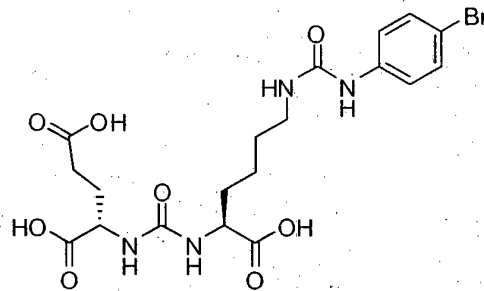
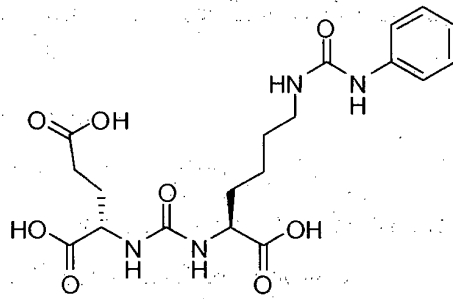
11. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el compuesto es:











o

5

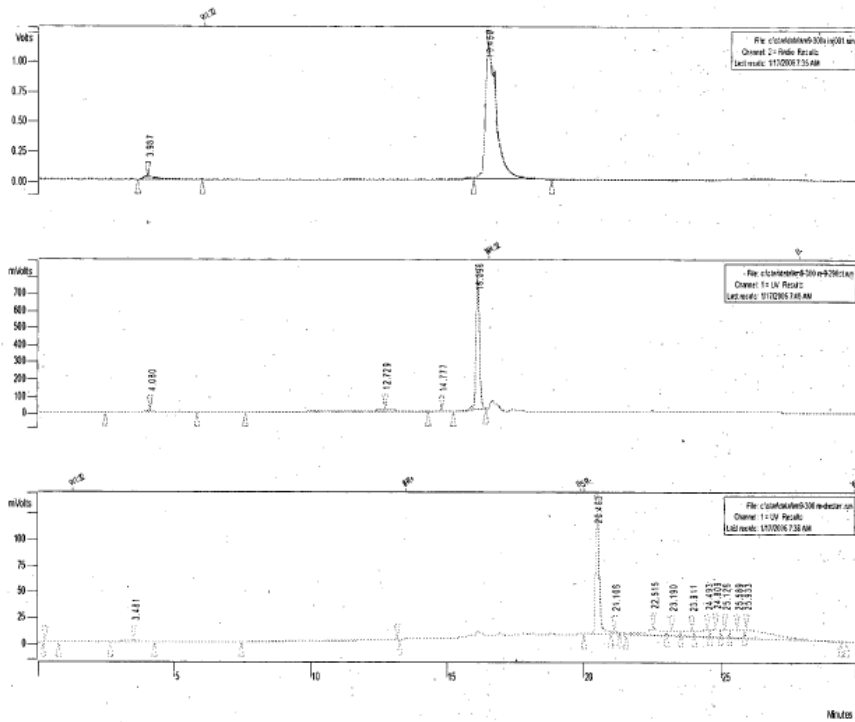
12. Complejo quelato de radionucleido que comprende el compuesto o una sal derivada de cualquiera de las reivindicaciones 1-11.

10 13. Complejo quelato de radionucleido según la reivindicación 12, donde el radionucleido es un radionucleido de formación de imágenes o un radionucleido terapéutico.

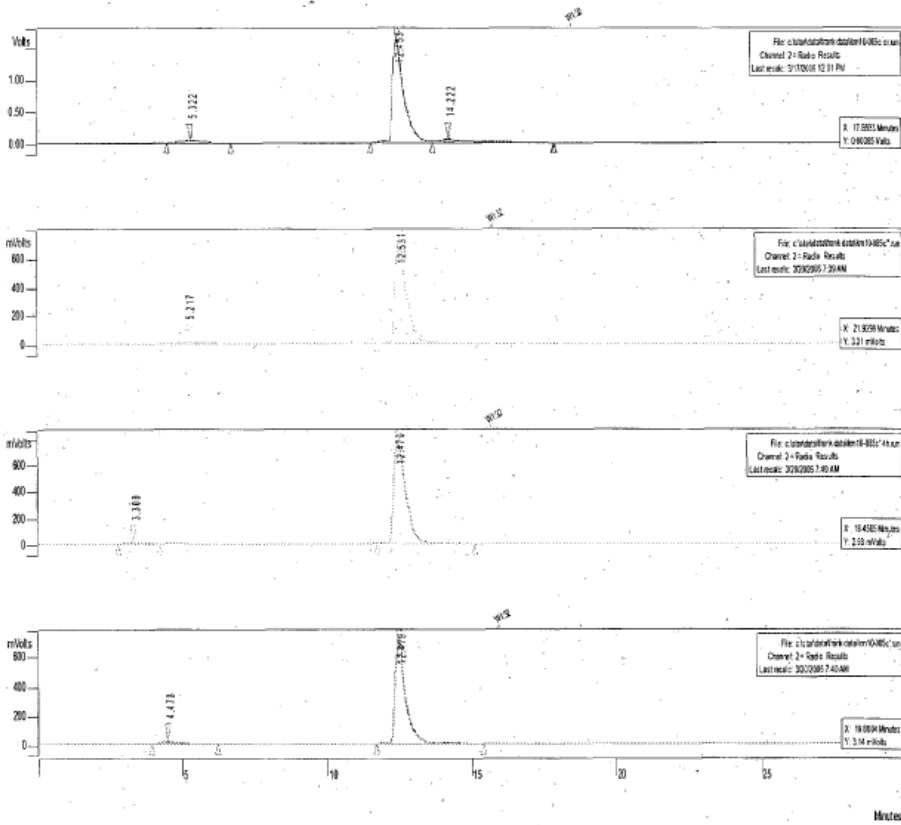
14. Complejo de quelato de radionucleido según la reivindicación 12 o reivindicación 13, donde el radionucleido es un complejo de quelato (tecnecio-99m) $Tc(CO)_3$  o complejo de quelato (renio-186/188) $Re(CO)_3$ .

15

15. Compuesto o una sal derivada de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso como agente de direccionamiento, como agente de diagnóstico o terapéutico para el tratamiento del cáncer de próstata y otras enfermedades relacionadas con la inhibición de la NAALADasa.

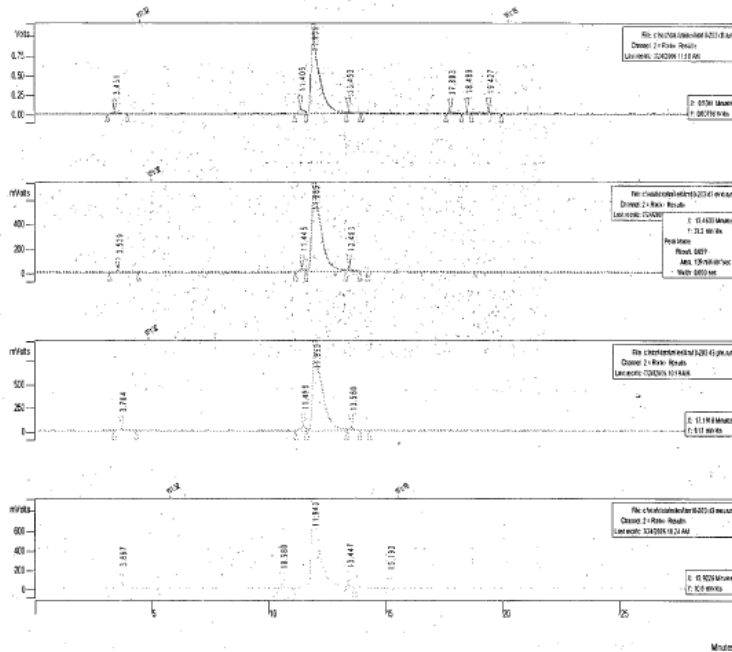


Figuras 1A, 1B y 1C



Figuras 2A-2D





Figuras 4A-4D

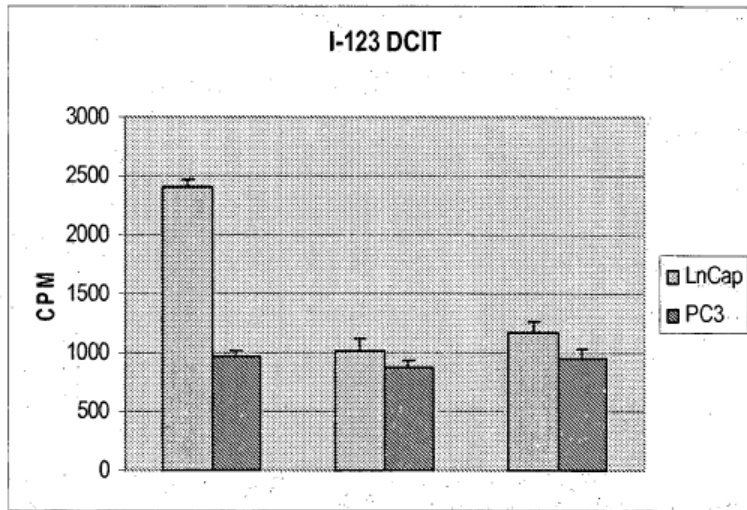


Figura 5

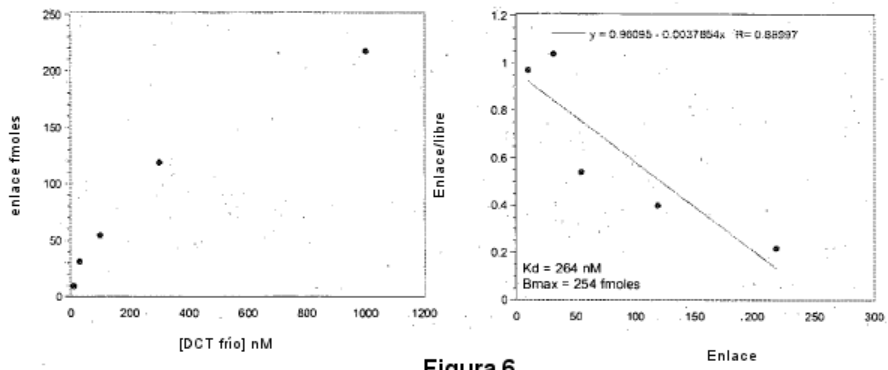


Figura 6

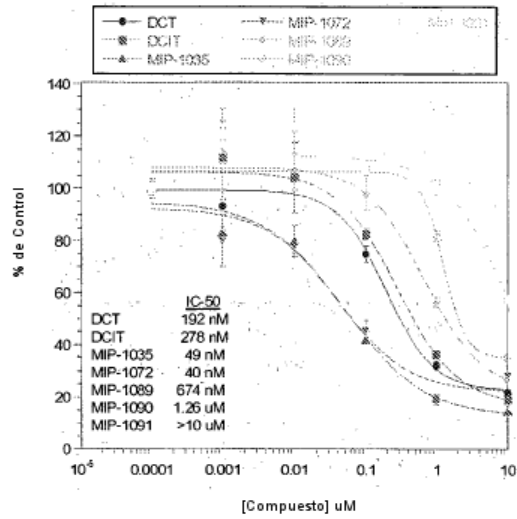


Figura 7

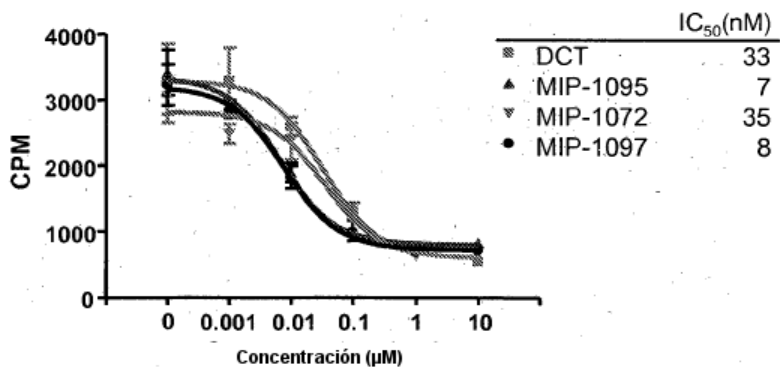
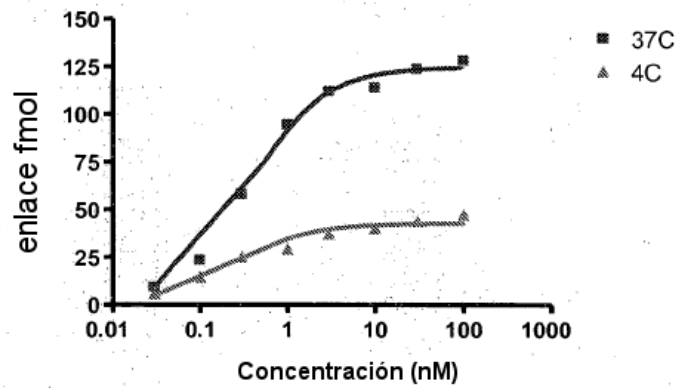


Figura 8



	4 °C	37 °C
Bmax (fmol/10 <sup>6</sup> células)	168	600
Kd (nM)	0,25	0,36

Figura 9

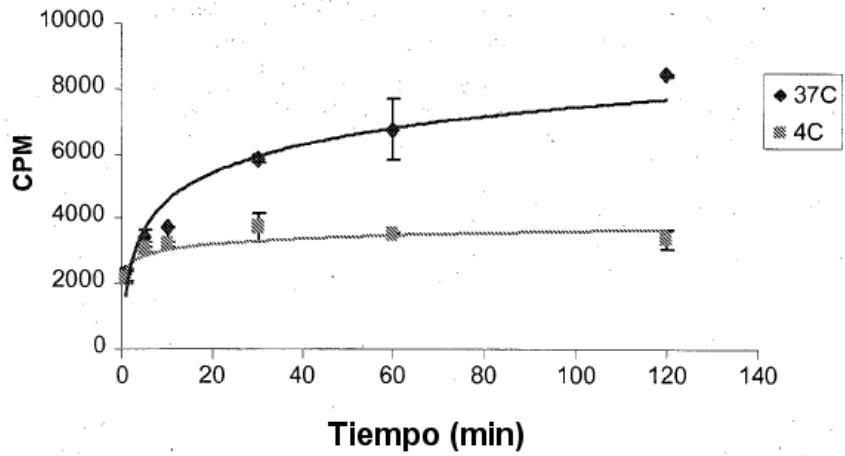
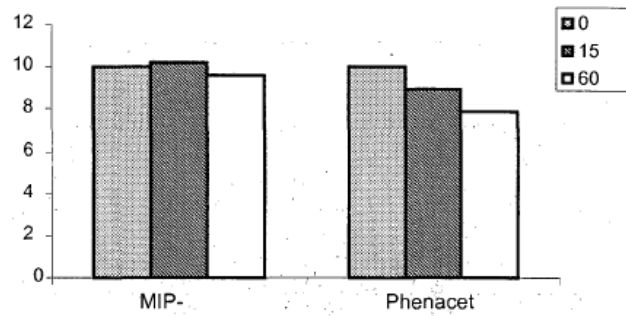


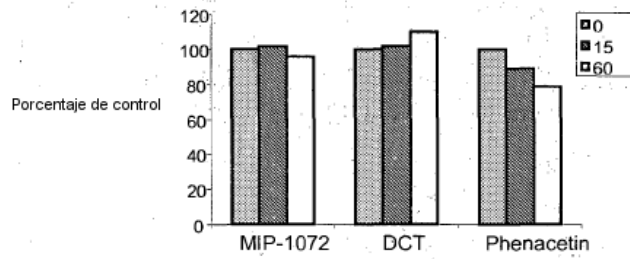
Figura 10



Metabolismo de MIP-1072 y Phenacetin by hígado de rata



Metabolismo de MIP-1072, DCT y Phenacetin by hígado de rata



Figuras 11A y 11B

Biodistribución de  $[^{131}\text{I}]\text{MIP1072}$  en ratones SCID que portan LNCaP y PC-3

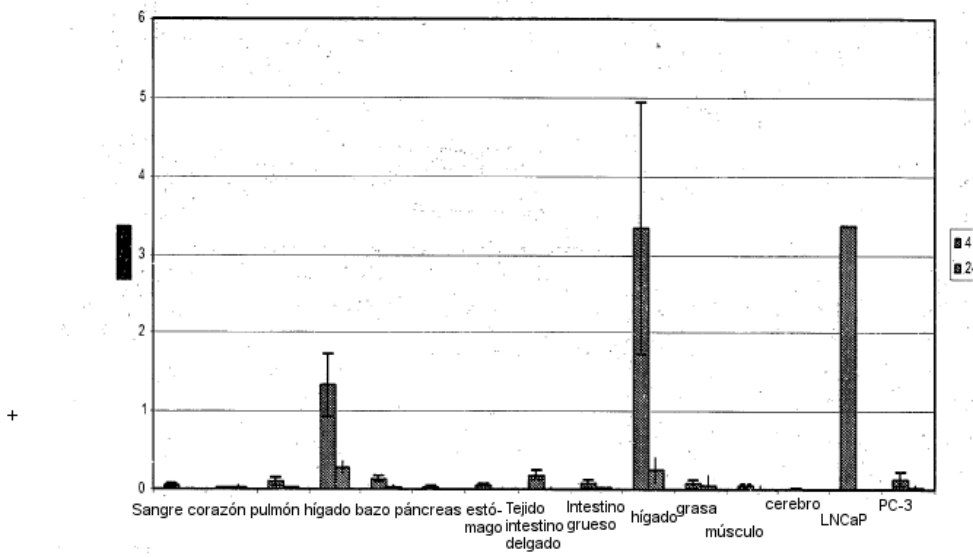


Figura 12

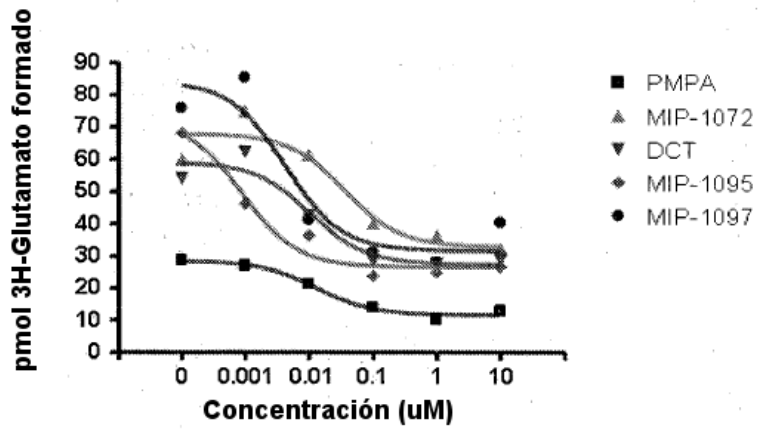


Figura 13

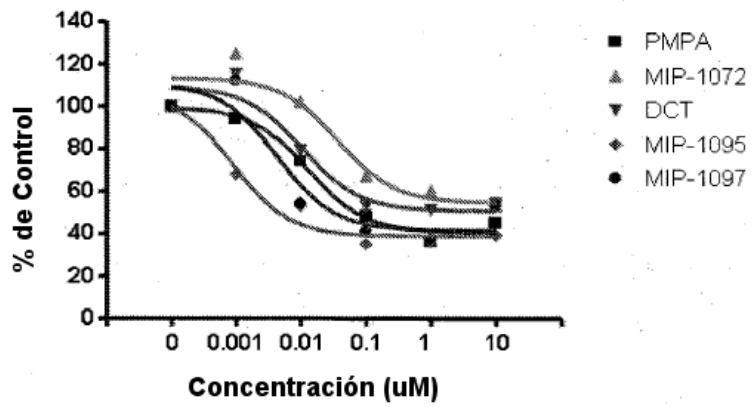


Figura 14

Compuesto	$K_i$ (nM)
PMPA	2.2
DCT	1.8
MIP-1072	6.1
MIP-1095	0.2
MIP-1097	0.7

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

$[S] = 1000 \text{ nM}$       $K_m = 200 \text{ nM}$

Figura 15

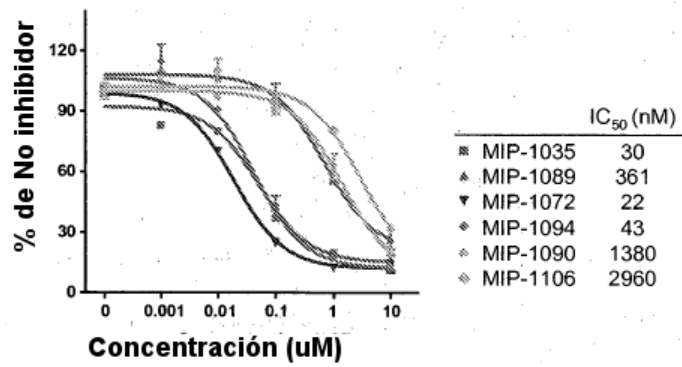


Figura 16

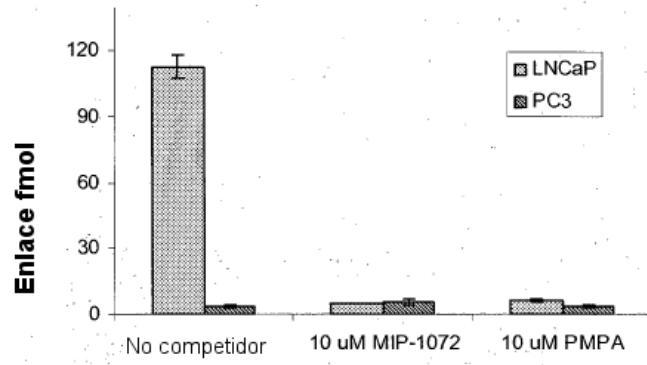


Figura 17

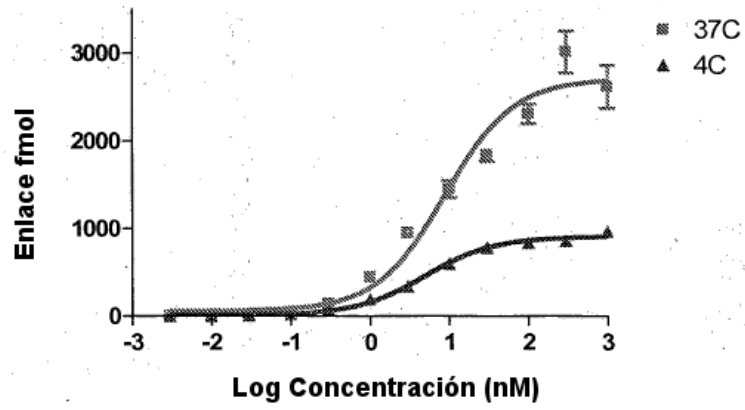


Figura 18

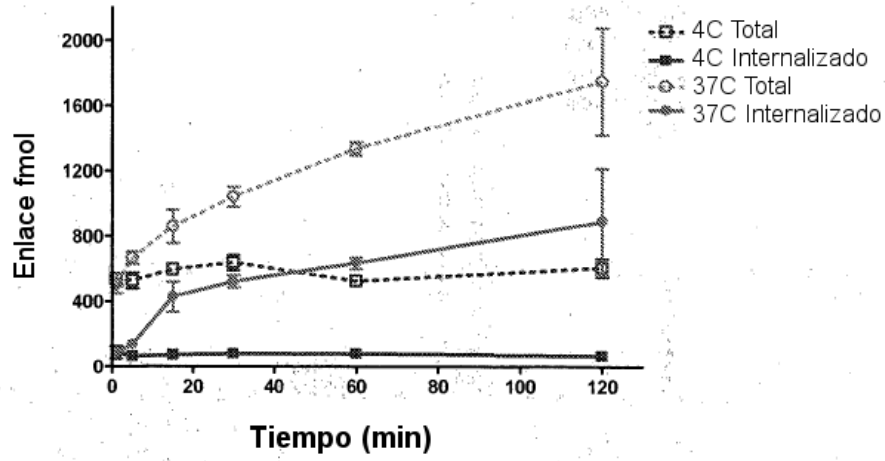


Figura 19

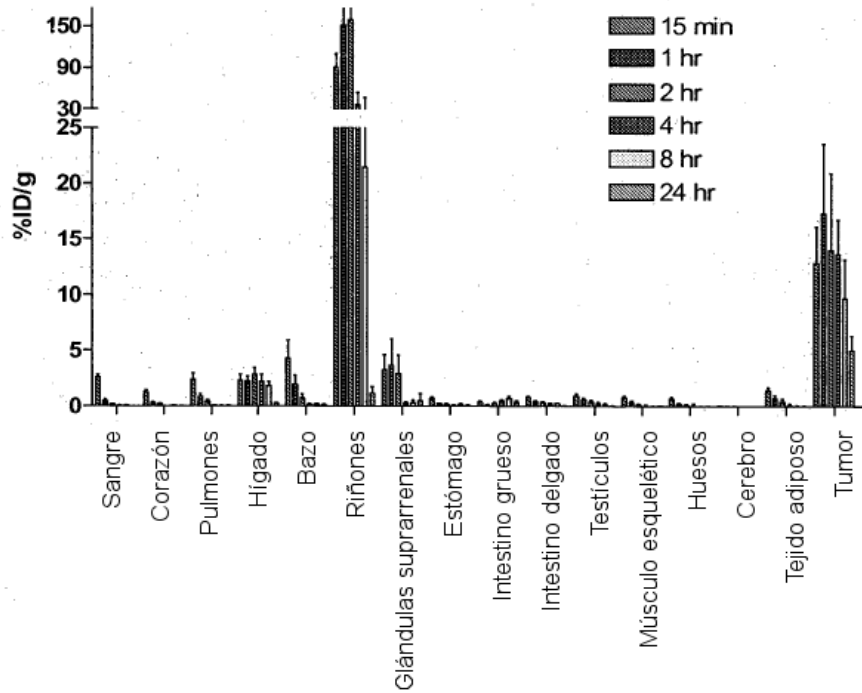
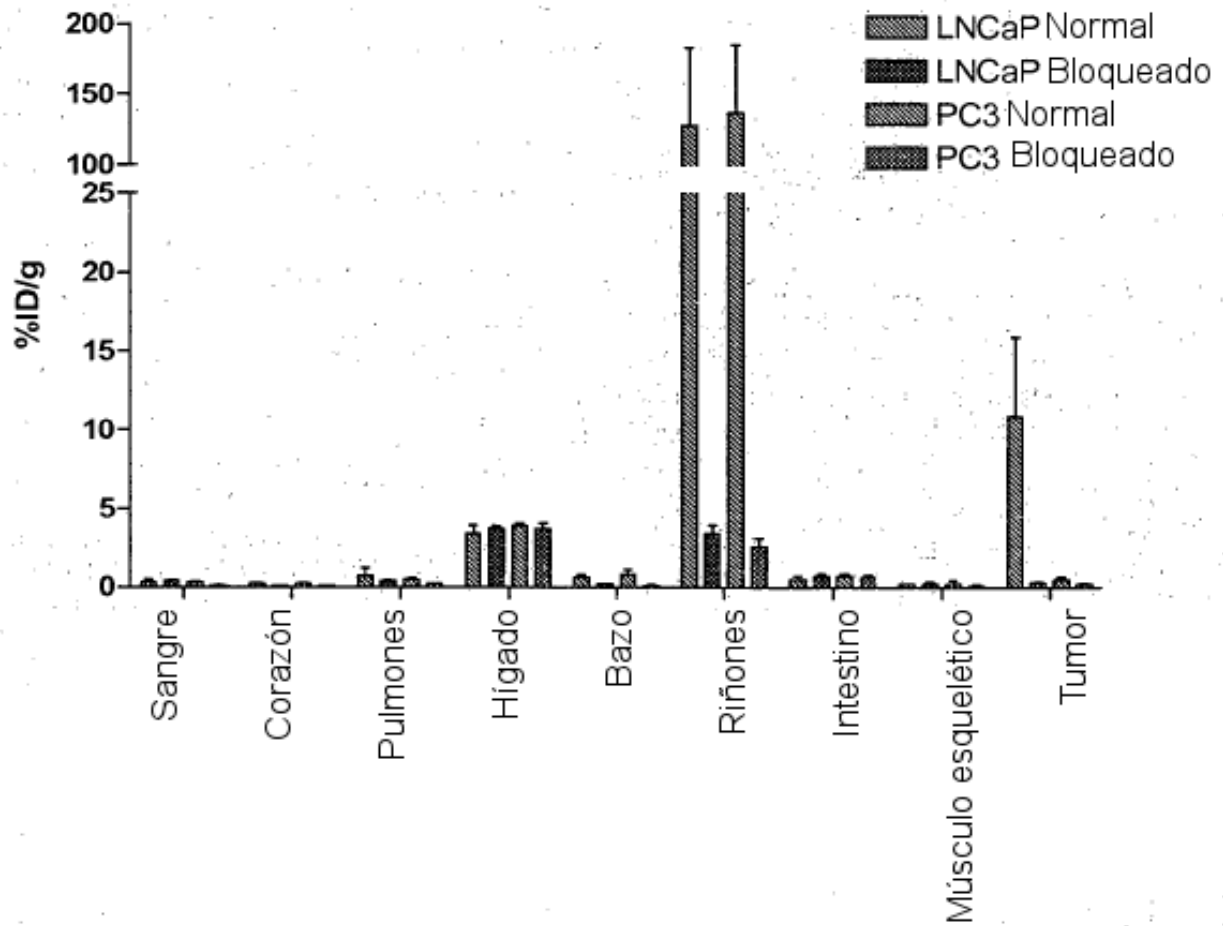


Figura 20



**Figura 21**