(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 700 234**

(51) Int. CI.:

C07D 213/38	(2006.01)	***A61K 51/04***	(2006.01)
C07D 215/12	(2006.01)	***A61K 31/4402***	(2006.01)
A01N 47/28	(2006.01)	***A61K 38/06***	(2006.01)
A61K 31/17	(2006.01)		
C07F 13/00	(2006.01)		
C07D 257/00	(2006.01)		
G01N 33/574	(2006.01)		
A61K 31/145	(2006.01)		
A61K 31/195	(2006.01)		
A61K 31/395	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2008 E 14195837 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2921482**

(54) Título: **Inhibidores marcados del antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), evaluación biológica y uso como agentes para la obtención de imágenes**

(30) Prioridad:

26.06.2007 US 937242 P
15.01.2008 US 11111 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.02.2019

(73) Titular/es:

THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (100.0%)
3400 North Charles Street
Baltimore, MD 21218, US

(72) Inventor/es:

POMPER, MARTIN GILBERT;
RAY, SANGEETA;
MEASE, RONNIE C. y
FOSS, CATHERINE

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores marcados del antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), evaluación biológica y uso como agentes para la obtención de imágenes

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención.

La presente invención proporciona nuevos compuestos como se definen en las reivindicaciones que comprenden un derivado de urea, un enlazante y un grupo quelante de metales. La invención proporciona nuevos compuestos radiomarcados correspondientes que comprenden un derivado de urea, un enlazante, un grupo quelante de metales y un metal radiomarcado o marcado isotópicamente. Esta invención también proporciona composiciones farmacéuticas envasadas que comprenden tales compuestos radiomarcados. Los compuestos de la invención son útiles para proporcionar un diagnóstico precoz de cánceres, imágenes de angiogénesis tumoral, delineación mejorada de los márgenes tumorales durante la cirugía tumoral y mejoras en la administración de pequeñas moléculas de radionúclidos terapéuticos al cáncer.

2. Antecedentes

El cáncer de próstata (PCa) es el principal cáncer en la población de los EE. UU. y la segunda causa principal de muerte relacionada con el cáncer en los hombres. Al momento del diagnóstico, solo la mitad de los tumores de PCa están localizados clínicamente y la mitad de ellos representan diseminación extracapsular. Actualmente, los procedimientos anatómicos, tales como tomografía computarizada (CT), la imagen por resonancia magnética (MR) y la ecografía, predominan en la imagen clínica del cáncer de próstata. El anticuerpo monoclonal radiomarcado [^{111}In] ProstaScint™ también se ha usado, sin embargo, este agente tiende a producir imágenes que son difíciles de interpretar (Lange, P. H. PROSTASCINT scan for staging prostate cancer. Urology 2001, 57, 402-406; Haseman, M. K.; et al. Cancer Biother Radiopharm 2000, 15, 131-140; Rosenthal, S. A.; et al. Tech Urol 2001, 7, 27-37). Los agentes para la obtención de imágenes basados en radiofármacos de bajo peso molecular pueden proporcionar una farmacocinética superior para la obtención de imágenes que los anticuerpos radiomarcados, que tienden a tener largos tiempos de circulación y un retraso en el aclaramiento de tejidos no específicos. Actualmente se está buscando clínicamente una variedad de agentes experimentales para la obtención de imágenes de PCa de bajo peso molecular, incluyendo análogos de colina radiomarcados [^{18}F]fluorodihidrotestosterona([^{18}F]FDHT), ácido anti-1-amino-3-[^{18}F]fluorociclobutil-1-carboxílico (anti[^{18}F]F-FACBC), [^{11}C]acetato y 1-(2-deoxi-2-[^{18}F]fluoro-L-arabinofuranosil)-5-metiluracil ([18F]FMAU) (Scher, B.; et al. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2007, 34, 45-53; Rinnab, L.; et al. BJU Int 2007, 100, 786-793; Reske, S. N.; et al. J Nucl Med 2006, 47, 1249-1254; Zophel, K.; Kotzerke, J. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2004, 31, 756-759; Vees, H.; et al. BJU Int 2007, 99, 1415-1420; Larson, S. M.; et al. J Nucl Med 2004, 45, 366-373; Schuster, D. M.; et al. J Nucl Med 2007, 48, 56-63; Tehrani, O. S.; et al. J Nucl Med 2007, 48, 1436-1441).

Cada uno opera por un mecanismo diferente y tiene ciertas ventajas, por ejemplo, baja excreción urinaria para [^{11}C] colina, y desventajas, tales como la corta vida media física de los radionúclidos emisores de positrones. Una nueva serie prometedora de agentes para la obtención de imágenes de bajo peso molecular se dirige al antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) (Mease R.C. et al. Clin Cancer Res. 2008, 14, 3036-3043; Foss, C. A.; et al. Clin Cancer Res 2005, 11, 4022-4028; Pomper, M. G.; et al. Mol Imaging 2002, 1, 96-101; Zhou, J.; et al. Nat Rev Drug Discov 2005, 4, 1015-1026).

PSMA es una proteína de membrana integral de tipo II que tiene una expresión abundante y restringida en la superficie de PCa, particularmente en enfermedades avanzadas y metastásicas independientes de andrógenos (Schulke, N.; et al. Proc Natl Acad Sci USA 2003, 100, 12590-12595). Lo último es importante ya que casi todos los PCa se vuelven independientes de andrógenos. También se expresa dentro del endotelio de la mayoría de los tumores sólidos distintos de la próstata (Chang, S. S.; et al. Cancer Res 1999, 59, 3192-3198). La PSMA posee los criterios de un objetivo prometedor para la terapia, esto es, la expresión abundante y restringida (hacia la próstata) en todas las etapas de la enfermedad, la presentación en la superficie celular pero no vertida en la circulación y la asociación con la actividad enzimática o de señalización (Schulke, N.; et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2003, 100, 12590-12595). El gen PSMA se encuentra en el brazo corto del cromosoma 11 y funciona como hidrolasa de folato y neuropeptidasa. Es la función neuropeptidasa que es equivalente a la glutamato carboxipeptidasa II (GCPII), que se conoce como el "PSMA cerebral", y puede modular la transmisión glutamatérgica al escindir N-acetilalaspartilglutamato (NAAG) a N-acetilaspartato (NAA) y glutamato (Nan, F.; et al. J Med Chem 2000, 43, 772-774). Hay hasta 10^6 moléculas de PSMA por célula cancerosa, lo que sugiere que es un objetivo ideal para la obtención de imágenes y la terapia con técnicas basadas en radionúclidos (Tasch, J.; et al. Crit Rev Immunol 2001, 21, 249-261).

Recientemente se demostró la obtención de imágenes selectivas de xenoinjertos que expresan PSMA usando tomografía por emisión de positrones (PET) de animales pequeños y tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) y los inhibidores de PSMA basados en urea *N*-[*N*-[(*S*)-1,3-dicarboxipropil]carbamoil]-*(S)*-[^{11}C]metil-L-cisteina, [^{11}*C*]DCMC, *N*-[*N*-[(*S*)-1,3-dicarboxipropil] carbamoil]-*(S)*-3-[^{125}I]yodo-L-tirosina, [^{125}I]DCIT y *N*-[*N*-[(*S*)-1,3-

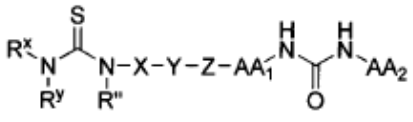
dicarboxipropil]carbamoil]-*(S)*-4-[^{18}F]fluorobencil-L-cisteina, [^{18}F]DCFBC (Mease R.C. et al. Clin Cancer Res. 2008, 14, 3036-3043; Foss, C. A.; et al. Clin Cancer Res 2005, 11, 4022-4028; Pomper, M. G.; et al. Mol Imaging 2002, 1, 96-101).

Aunque los radionúclidos emisores de positrones se usan cada vez más en medicina clínica, ^{99m}Tc sigue siendo el radionúclido de elección para la obtención de imágenes escintigráficas clínicas debido a sus propiedades físicas favorables ($t_{1/2}$ = 6h, $E\gamma$ = 140 keV), bajo costo y disponibilidad generalizado. El desarrollo de complejos de tecnecio como radiofármacos se ve facilitado por el uso de renio, el congreso del grupo VIIB de tecnecio. El renio generalmente produce complejos con propiedades físicas similares a las del tecnecio y se usa a menudo como una alternativa no radioactiva al tecnecio para la síntesis a gran escala y la caracterización estructural.

Lo que se desea es proporcionar inhibidores basados en urea de bajo peso molecular que incorporen quelantes tridentados para la unión del núcleo $\{M(CO)_3\}^+$, (M = ^{99m}Tc, $^{186, 188}$Re), mientras se mantiene una alta afinidad con el PSMA. Debido a la alta estabilidad y las características de marcado favorables, el enfoque organometálico $Re(I)(CO)_3$/^{99m}Tc(I)$(CO)_3$ representa una estrategia atractiva de radiomarcación Se sabe que un número de quelatos tridentados con diferentes grupos de átomos de nitrógeno, azufre y oxígeno forman complejos altamente estables con los núcleos $\{M(CO)_3\}^+$ (Alberto, R.; et al. J Am Chem Soc 1998, 120, 7987-7988; Alberto, R.; et al. J Am Chem Soc 2001, 123, 3135-3136). Entre ellos, el concepto de quelato de un solo aminoácido (Banerjee, S. R.; et al. Nucl Med Biol 2005, 32, 1-20; Stephenson, K. A.; et al. Bioconjug Chem 2005, 16, 1189-1195), (SAAC), ha demostrado ser útil para diseñar nuevos inhibidores basados en urea.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un compuesto de fórmula VII:

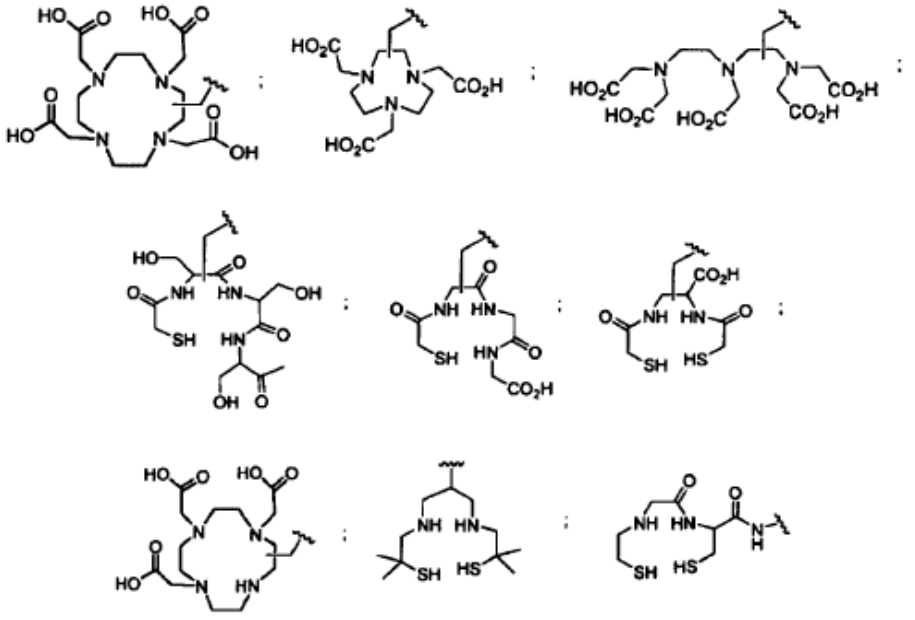


(VII);

en la que

R" es H o H o alquilo C_1-C_6;

R^x es arilo sustituido con:



R^y es H o alquilo C_1-C_6;

AA_1 y AA_2 son cada uno independientemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina, ácido glutámico, tirosina y cisteína;

X y Z son cada uno independientemente alquileno C_1-C_8, alquenilo C_2-C_8, alquinilo C_2-C_8, heteroalquilo C_1-C_8, heteroalquenilo C_2-C_8, heteroalquinilo C_2-C_8, alcoxi C_1-C_8, o un enlace, cada uno de los cuales puede ser sustituido con 0-5 R_A;

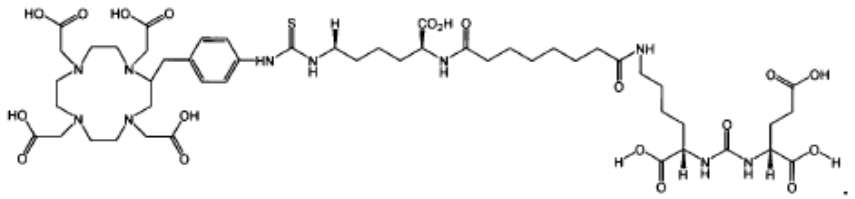
Y es -O-, -$S(O)_p$-, -NH-, -CH=CH-, -NH-CO-, -NH-CO_2-, -CO-NH-, -CO_2-NH-, o un enlace;

p es 0, 1, o 2;

R_A, para cada aparición, es CO_2H.

En una realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula VII como se define anteriormente, en el que R" y R^y son H.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de fórmula VII como se define anteriormente, en el que el compuesto de fórmula (VII) tiene la siguiente estructura:



En otra realización, la invención proporciona un compuesto como se define anteriormente, que comprende al menos un isótopo radiactivo.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto que comprende al menos un isótopo radiactivo como se define anteriormente, en el que el isótopo radiactivo se selecciona del grupo que consiste en Tc-99m, Re-188, Re-186, Ga-68, Cu-64, Y-90, Y-86, Ac-225, Bi-213, In-111, Tc-94m, Sm-153, Ho-166,Lu-177, Cu-67, y Dy-166.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto que comprende al menos un isótopo radiactivo como se define anteriormente para su uso en una composición farmacéutica envasada.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto que comprende al menos un isótopo radiactivo como se define anteriormente para su uso en un procedimiento de obtención de imágenes en un sujeto.

En otra realización más, la invención proporciona un compuesto que comprende al menos un isótopo radioactivo para su uso en un procedimiento de obtención de imágenes en un sujeto como se define anteriormente, para su uso en el diagnóstico de cáncer.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Microscopía de fluorescencia de células PSMA+ PC-3 PIP y células de la gripe PSMA-PC-3 usando Re**L2**.

Figura 2. Modo de enlace de **L1** al sitio activo de PSMA (A). El mapa de contorno correspondiente se muestra en B.

Figura 3. Obtención de imágenes SPECT-CT de ratones portadores de tumores con [^{99m}Tc] **L1-L4** (A-D, respectivamente). SPECT-CT doble de agujero estenopeico de ratones portadores de tumores de la gripe PC-3 PIP y PC-3. Los ratones fueron inyectados con 0,5-1 mCi (19-37 MBq) de radiofármaco i.v. seguido de un período de captación de 45 min. Se debe tener en cuenta que esencialmente no hay captación en los tumores de la gripe-PSMA en cada caso. La radiactividad abdominal se debe principalmente a la captación en el hígado, el bazo y los riñones. Las líneas horizontales en B se deben a un artefacto de reconstrucción en los límites del campo de visión. PIP = PC-3 PIP; gripe = PC-3 gripe; GB = vesícula biliar en C; los círculos rojos resaltan la ubicación de los riñones en D; L = izquierda, R = derecha.

Figura 4. Obtención de imágenes de SPECT-CT de ratones portadores de tumores con [^{99m}Tc] **L1** y [^{99m}Tc] **L3** (A y B, respectivamente). SPECT-CT doble de agujero estenopeico de ratones portadores de tumores de la gripe PC-3 PIP y PC-3. Los ratones fueron inyectados con 0,5-1 mCi (19-37 MBq) de radiofármaco i.v. seguido de un período de captación de 3,5 - 4 h. Se debe tener en cuenta la falta de radiofármacos fuera del tumor en A; Sin embargo, los riñones están fuera del campo de visión.

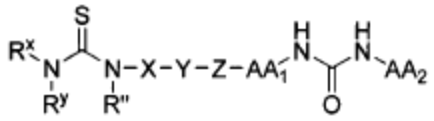
Figura 5. Obtención de imágenes de SPECT-CT de ratones portadores de tumores LNCaP (PSMA+) con [^{99m}Tc] **L1** con (izquierda) y sin (derecha) bloqueo de PSMA usando el potente inhibidor selectivo de PSMA, PMPA, como agente bloqueador. La falta de radiofármacos tanto en el tumor como en los riñones (otro sitio

de PSMA+) tras el cotratamiento con PMPA proporciona una verificación adicional de la unión específica de PSMA. Las imágenes fueron adquiridas a partir de 30-60 min postinyección. T = tumor; K = riñón.

Figura 6. Obtención de imágenes de SPECT-CT de ratón portador de tumor con [^{111}In] -DOTA-L1. SPECT-CT doble de agujero estenopeico de ratón portador de tumor de gripe PC-3 PIP y PC-3. El ratón se inyectó con 0,5 mCi (19 MBq) de radiofármaco i.v. seguido de un período de captación de 3,5 - 4 h.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un compuesto que comprende un inhibidor, un enlazante y un quelante de metal, en el que el inhibidor es un inhibidor del antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), en particular un compuesto de fórmula VII:

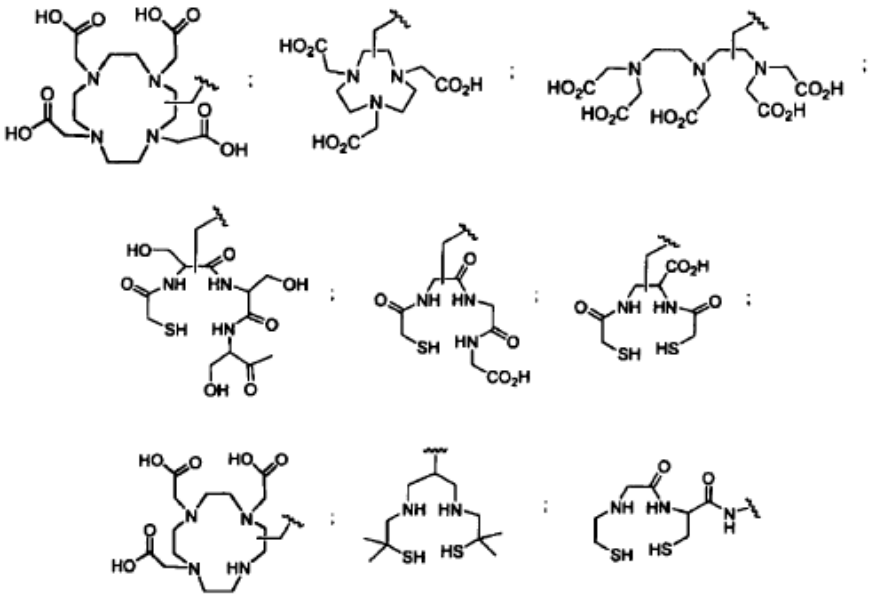


(VII);

en la que

R" es H o H o alquilo C_1-C_6;

R^x es arilo sustituido con:



R^y es H o alquilo C_1-C_6;

AA_1 y AA_2 son cada uno independientemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina, ácido glutámico, tirosina y cisteína;

X y Z son cada uno independientemente alquileno C_1-C_8, alquenilo C_2-C_8, alquinilo C_2-C_8, heteroalquilo C_1-C_8, heteroalquenilo C_2-C_8, heteroalquinilo C_2-C_8, alcoxi C_1-C_8, o un enlace, cada uno de los cuales puede ser sustituido con 0-5 R_A;

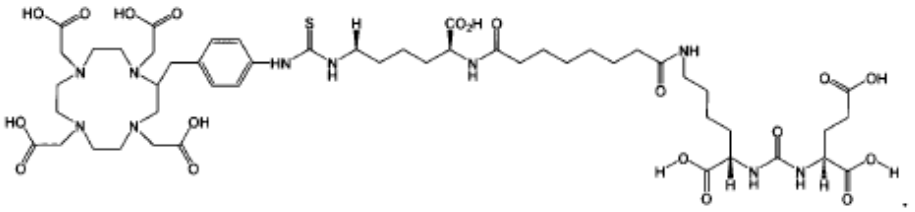
Y es -O-, -S (O) p-, -NH-, -CH = CH-, -NH-CO-, -NH-CO2-, -CO-NH-, -CO2-NH-, o un enlace;

Y es -O-, -$S(O)_p$-, -NH-, -CH=CH-, -NH-CO-, -NH-CO_2-, -CO-NH-, -CO_2-NH-, o un enlace;

p es 0, 1, o 2;

R_A, para cada aparición, es CO_2H,.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona el siguiente compuesto:



En ciertas realizaciones, un compuesto de la invención comprende al menos un isótopo radiactivo.

Ciertos compuestos preferidos de la invención incluyen aquellos que comprenden al menos un isótopo radiactivo o más preferiblemente uno o más isótopos radiactivos que emiten positrones. En ciertas realizaciones, la invención proporciona compuestos que comprenden uno o más radioisótopos apropiados para su uso en radioterapia. En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención comprenden al menos un isótopo radiactivo de tecnecio, renio, galio, indio, cobre, itrio, actinio, bismuto, samario, disprosio, holmio o lutecio, incluidos los isótopos radiactivos seleccionados de Tc-99m, Tc-94m, Re-186, Re-188, Ga-68, Cu-64, Cu-67, Y-90, Y-86, Ac-225, Bi-213, In-111, Sm-153, Ho-166, Lu-177, y Dy-166.

Diversos compuestos de la invención, particularmente compuestos apropiados para su uso en los procedimientos de obtención de imágenes proporcionados por la invención, incluyen uno o más radioisótopos capaces de emitir una o más formas de radiación que son apropiados para detección con cualquier equipo de radiología estándar tal como PET, SPECT, cámaras gamma, MRI y similares.

La invención incluye además el uso de compuestos de la invención que son capaces de generar al menos una proporción para objetivo/fondo de intensidad de radiación de 2:1, o más preferiblemente una proporción de aproximadamente 5:1, de aproximadamente 10:1 o de aproximadamente 15:1 de intensidad de radiación entre el objetivo y el fondo en un procedimiento de obtención de imágenes.

Adicionalmente, los compuestos de la invención se excretan de los tejidos del cuerpo rápidamente para evitar la exposición prolongada a la radiación del compuesto radiomarcado administrado al paciente. Por lo general, los compuestos de la invención se eliminan del cuerpo en menos de aproximadamente 24 horas. Más preferiblemente, los compuestos de la invención se eliminan del cuerpo en menos de aproximadamente 16 horas, 12 horas, 8 horas, 6 horas, 4 horas, 2 horas, 90 minutos o 60 minutos. Por lo general los compuestos preferidos se eliminan entre aproximadamente 60 minutos y aproximadamente 120 minutos.

Los compuestos preferidos de la invención son estables in vivo, de manera que prácticamente todos, por ejemplo, más de aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o más preferiblemente el 90 % del compuesto inyectado no es metabolizado por el cuerpo antes a la excreción.

Los sujetos típicos a los que se pueden administrar compuestos de la invención serán mamíferos, particularmente primates, especialmente seres humanos. Para aplicaciones veterinarias, una amplia variedad de sujetos será apropiada, por ejemplo, ganado tal como vacuno, ovejas, cabras, vacas, cerdos y similares; aves de corral tales como pollos, patos, gansos, pavos y similares; y animales domesticados, particularmente mascotas tal como perros y gatos. Para aplicaciones de diagnóstico o investigación, una amplia variedad de mamíferos serán sujetos apropiados, incluidos roedores (por ejemplo, ratones, ratas, hámsteres), conejos, primates y cerdos, tal como cerdos consanguíneos y similares. Además, para aplicaciones in vitro, tales como aplicaciones de diagnóstico e investigación in vitro, los fluidos corporales y las muestras celulares de los sujetos anteriores serán apropiados para su uso como mamíferos, particularmente primates tal como muestras de sangre, orina o tejido humanos, o muestras de tejidos, orina, sangre de los animales mencionados para aplicaciones veterinarias.

La presente invención también proporciona un compuesto de la invención para su uso en composiciones farmacéuticas envasadas, en el que dicha composición farmacéutica envasada comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un compuesto de la invención. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica envasada comprenderá los precursores de reacción necesarios para generar el compuesto de la invención tras la combinación con un precursor radiomarcado.

También se describe un kit que contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 mCi del agente de obtención de imágenes marcado con radionúclido descrito anteriormente, en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. El portador y el agente de obtención de imágenes se pueden proporcionar en solución o en forma liofilizada. Cuando el portador y el agente de obtención de imágenes del kit están en forma liofilizada, el kit puede contener opcionalmente un medio de reconstitución estéril y fisiológicamente aceptable, tal como agua, solución salina, solución salina regulada y similares.

El kit puede proporcionar un compuesto de la invención en solución o en forma liofilizada, y estos componentes del kit de la invención pueden contener opcionalmente estabilizantes tales como NaCl, silicato, soluciones reguladoras

de fosfato, ácido ascórbico, ácido gentísico y similares. Se describe la estabilización adicional de los componentes del kit, proporcionando el agente reductor en una forma resistente a la oxidación.

La determinación y optimización de tales estabilizadores y procedimientos de estabilización están dentro del nivel de habilidad en el arte. Cuando la molécula diana/agente quelante está en forma liofilizada, el kit puede contener opcionalmente un medio de reconstitución estéril y fisiológicamente aceptable, como agua, solución salina, solución salina regulada y similares. Las cantidades de molécula diana/agente quelante no marcado, molécula auxiliar y agente reductor se optimizan según los procedimientos de preparación del agente de obtención de imágenes cardiovasculares expuesto anteriormente. Además, se describen los radionúclidos, que incluyen, pero no se limitan a, ^{99m}Tc obtenidos de un generador de ^{99}Mo/^{99}mTc disponible comercialmente, que se pueden combinar con la molécula diana/agente quelante no marcado y el agente reductor durante un tiempo y a una temperatura suficiente para quelar el radionúclido a la molécula diana/agente quelante, y se inyecta al paciente el agente de obtención de imágenes formado de este modo.

Los agentes para la obtención de imágenes de la invención se pueden usar según los usos de la invención por un experto en el arte. Las imágenes se pueden generar en virtud de las diferencias en la distribución espacial de los agentes para la obtención de imágenes que se acumulan en un sitio cuando se ponen en contacto con PSMA. La distribución espacial se puede medir usando cualquier medio apropiado para la etiqueta particular, por ejemplo, una cámara gamma, un aparato PET, un aparato SPECT, y similares. El grado de acumulación del agente de obtención de imágenes se puede cuantificar usando procedimientos conocidos para cuantificar las emisiones radiactivas. Un enfoque de obtención de imágenes particularmente útil emplea más de un agente de obtención de imágenes para realizar estudios simultáneos.

Preferiblemente, una cantidad detectable eficaz del agente de obtención de imágenes de la invención se administra a un sujeto. De acuerdo con la invención, "una cantidad detectable eficaz" del agente de obtención de imágenes de la invención se define como una cantidad suficiente para producir una imagen aceptable usando un equipo que está disponible para uso clínico. Una cantidad detectable eficaz del agente de obtención de imágenes de la invención se puede administrar en más de una inyección. La cantidad detectable eficaz del agente de obtención de imágenes de la invención puede variar según factores tales como el grado de susceptibilidad del individuo, la edad, el sexo y el peso del individuo, las respuestas idiosincrásicas del individuo, la dosimetría. Las cantidades detectables efectivas del agente de obtención de imágenes de la invención también pueden variar según el instrumento y los factores relacionados con la película. La optimización de tales factores está bien dentro del nivel de habilidad en el arte.

La cantidad de agente de obtención de imágenes usado con fines de diagnóstico y la duración del estudio de obtención de imágenes dependerán del radionúclido usado para marcar el agente, la masa corporal del paciente, la naturaleza y la gravedad de la afección que se trata, la naturaleza de los tratamientos terapéuticos que ha sufrido el paciente y sobre las respuestas idiosincrásicas del paciente. En última instancia, el médico tratante decidirá la cantidad de agente de obtención de imágenes para administrar a cada paciente individual y la duración del estudio de obtención de imágenes.

Diseño basado en la estructura de inhibidores de unión de PSMA.

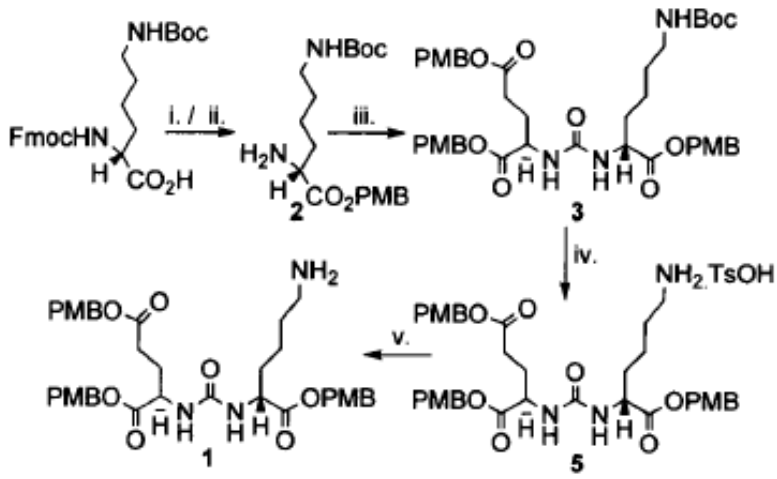
El sitio de unión de PSMA contiene un ion de zinc binuclear y dos bolsillos de unión del sustrato, esto es, un bolsillo S1 (sin farmacóforo) y un bolsillo S1' (farmacóforo). El sitio activo también contiene un ion cloruro en el bolsillo S1. Cerca del bolsillo S1 se encuentra un túnel en forma de embudo con una profundidad de aproximadamente 20 Å y un ancho de 8-9 Å. De manera similar, una cavidad estrecha está presente cerca del bolsillo S1'. Además, se ha determinado que la unidad estructural glutamato de los inhibidores tiene una predisposición a orientarse dentro del bolsillo estrecho S1', mientras que el resto de la molécula reside dentro del bolsillo S1 grande. Estas observaciones son similares para las estructuras cristalinas de rayos X de PSMA tras la cocristalización con compuestos en la serie de urea, a saber, DCMC, DCIT y DCFBC. Se deseaba sintetizar un conjugado entre un inhibidor a base de urea que contiene glutamato y los quelantes conocidos de $[Re(I)(CO)_3]^+$/$[^{99m}Tc(I)(CO)_3]^+$. En el diseño de estos nuevos conjugados, fue importante optimizar la interacción entre el PSMA y el quelante voluminoso. Considerando el diámetro de ~9 Å de las esferas de coordinación de tricarbonilo de renio y tricarbonilo de tecnecio con quelatos basados en piridilo, determinado a partir de las estructuras de cristales de rayos X, se encontró que el volumen promedio calculado del núcleo de tricarbonilo metálico con el quelato de bispiridilo era de ~378 Å. Para permitir la unión de alta afinidad de los supuestos agentes para la obtención de imágenes al PSMA, se unió un enlazante de metileno (> 20 Å) al resto de la molécula del α-carbono de la función urea. En consecuencia, se sintetizaron tres conjuntos de compuestos, cada uno con una longitud de enlazante diferente: **L1** - **L3**, con un enlazante de ~31,5 Å; **L4** y **L7** con longitud de enlazante de ~ 33 Å; y **L5** y **L6**, con longitudes de enlazante de ~22 Å y 7,7 Å, respectivamente.

Síntesis de quelantes unidos de urea.

Se desarrolló un número de inhibidores de PSMA que contenían lisina para usar la ε amina libre de lisina para la conjugación o derivación con un grupo quelante de metales apropiado. El compuesto 1 (Esquema 1) es un intermedio clave, integral a la síntesis de todos los supuestos agentes de obtención de imágenes descritos. El análogo **2** de lisina protegido se preparó en dos etapas. La N_ε-Boc-N_α-Fmoc-L-lisina disponible comercialmente se

hizo reaccionar con cloruro de 4-metoxibencilo y carbonato de cesio en N, N-dimetilformamida (DMF), seguido de la eliminación del grupo Fmoc usando piperidina al 20 % en DMF. La cromatografía instantánea proporcionó el compuesto **2** deseado con un rendimiento del 80 %. La urea **3** se obtuvo tratando Bis-4-metoxibencil-L-glutamato HCl, **4** con trifosgeno y trietilamina a -78 °C, seguido de una captura in situ del isocianato intermedio mediante la adición de **2**. La escisión selectiva del grupo N-Boc de **3** con ácido p-toluenosulfónico en etanol/acetato de etilo producido **5**. La extracción básica de una solución de **5** en CH_2Cl_2 dio la base libre **1**. El grupo p-metoxibencilo (PMB) se eliminó convenientemente a temperatura ambiente usando solución de ácido trifluoroacético (TFA)/anisol o TFA/CH_2Cl_2 en la etapa final después de realizar la conjugación requerida.

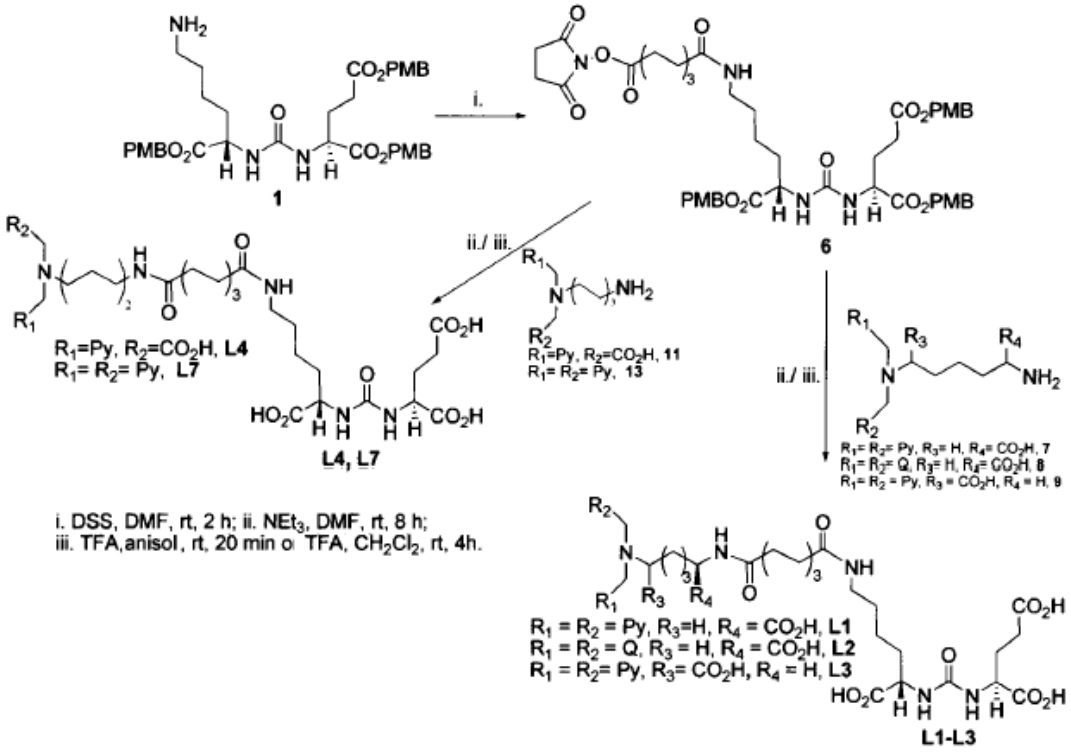
Esquema 1



PMB = grupo p-metoxibencilo; i. cloruro de 4-metoxibencilo, Cs_2CO_3, DMF, rt, 4h; ii. piperidina al 20%, DMF, rt, 20 min; iii. 4, Trifosgeno, NEt_3, CH_2Cl_2, -80 °C rt; iv. TsOH, Etanol, acetate de etilo, rt, 2h; v. 0,5 (N) $NaHCO_3$

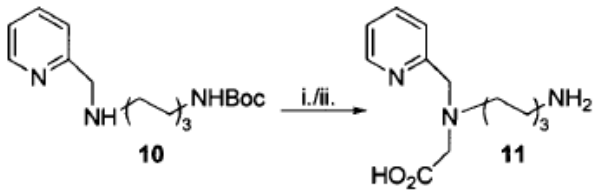
La síntesis de los quelantes y su conjugación con el intermedio **1** se presentan en los Esquemas 2-6. El compuesto **1** se usó para unir diferentes enlazantes, así como los quelantes de metales, para generar una nueva serie de inhibidores de PSMA, **L1**-L7 (no según la invención) para la coordinación de $\{^{99m}Tc(CO)_3\}^+$/$\{Re(CO)_3\}^+$. El intermedio **6** del éster de N-hidroxisuccinimida (NHS), mostrado en el Esquema 2, se preparó mediante la conjugación de 1 con exceso de suberato de disuccinimidilo (DSS) en DMF. El compuesto **6** se hizo reaccionar luego con tres quelantes de bispiridilo diferentes, **7**, **9** y **13**, un quelante de bisquinolina, **8**, y un quelante de monoácido de monopirilo, **11**, para preparar **L1-L4** y **L7**. Los quelantes **7**, **8**, **9** y **13** se prepararon según los procedimientos publicados (véanse los Ejemplos).

Esquema 2



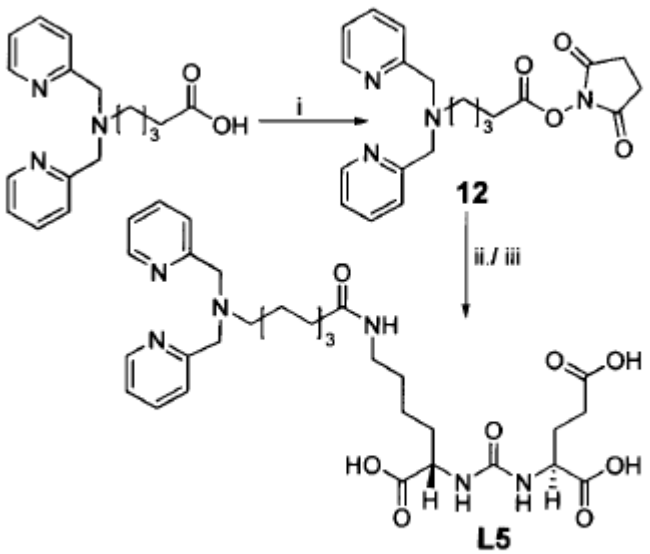
La síntesis del quelante de monoácido de monopirilo se realizó mediante la modificación de un procedimiento descrito previamente (Esquema 3). El compuesto **10** se preparó según un procedimiento informado anteriormente (veánse los Ejemplos). La aminación reductora de **10**, usando ácido glioxílico en presencia de triacetoxiborohidruro de sodio en dicloroetano, seguido de la eliminación del grupo protector usando una solución de TFA/CH_2Cl_2 a temperatura ambiente, produjo **11**.

Esquema 3



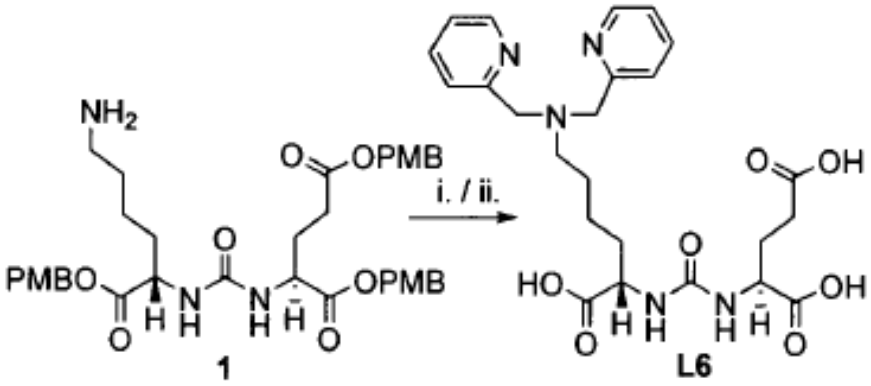
La síntesis de **L5** (no según la invención) se describe en el Esquema 4. El compuesto **12** se preparó mediante aminación reductiva de ácido 8-aminocaproico disponible comercialmente con piridina-2-carboxaldehído y triacetoxiborohidruro de sodio seguido de formación de éster de NHS con N -hidroxisuccinimida en presencia de O-benzotriazol-N, N, N ', N'-tetrametil-uronio-hexafluoro-fosfato (HBTU). El compuesto **L5** se obtuvo haciendo reaccionar **12** con 5 en CH_2Cl_2 y trietilamina, seguido de desprotección de los grupos PMB usando TFA/CH_2Cl_2. El compuesto **L6** (no según la invención) se preparó mediante una aminación reductiva de **1** usando piridina-2-carboxaldehído y triacetoxiborohidruro de sodio, seguido de desprotección de los grupos PMB usando TFA/CH_2Cl_2 (Esquema 5).

Esquema 4



i. N-hidroxisuccinimida, HBTU, DMF, 16 h;
ii. **5**, NEt_3, CH_2Cl_2; iii. TFA, CH_2Cl_2, 4h, 73%.

Esquema 5

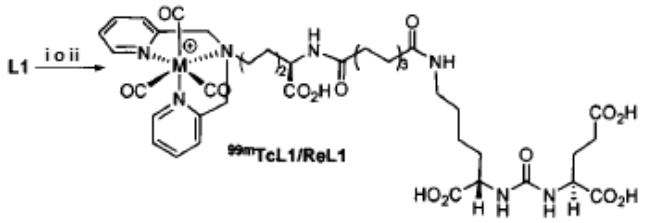


i. piridina-2-carboxaldehído, $NaBH(OAc)_3$, CH_2Cl_2, rt, 4h;
ii. TFA, CH_2Cl_2, rt, 2h.

Síntesis de los análogos del renio (ReL1-ReL7). (como referencia)

La síntesis de los compuestos $[Re(CO)_3L]^{+/0}$ (L = **L1-L7**) se realizó mediante una reacción de intercambio de ligandos usando el precursor de tricarbonilo de renio $[Re(CO)_3(H_2O)_3]Br$[37] como se muestra en el Esquema. 6 para **L1**. Cantidades equimolares del ligando (**L1**-**L7**) y el precursor se sometieron a reflujo bajo argón durante 3 h para proporcionar el correspondiente complejo de renio con un rendimiento cuantitativo en cada caso. La formación del complejo se controló mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Todos los complejos se purificaron mediante HPLC y se caracterizaron mediante procedimientos espectroscópicos estándar.

Esquema 6

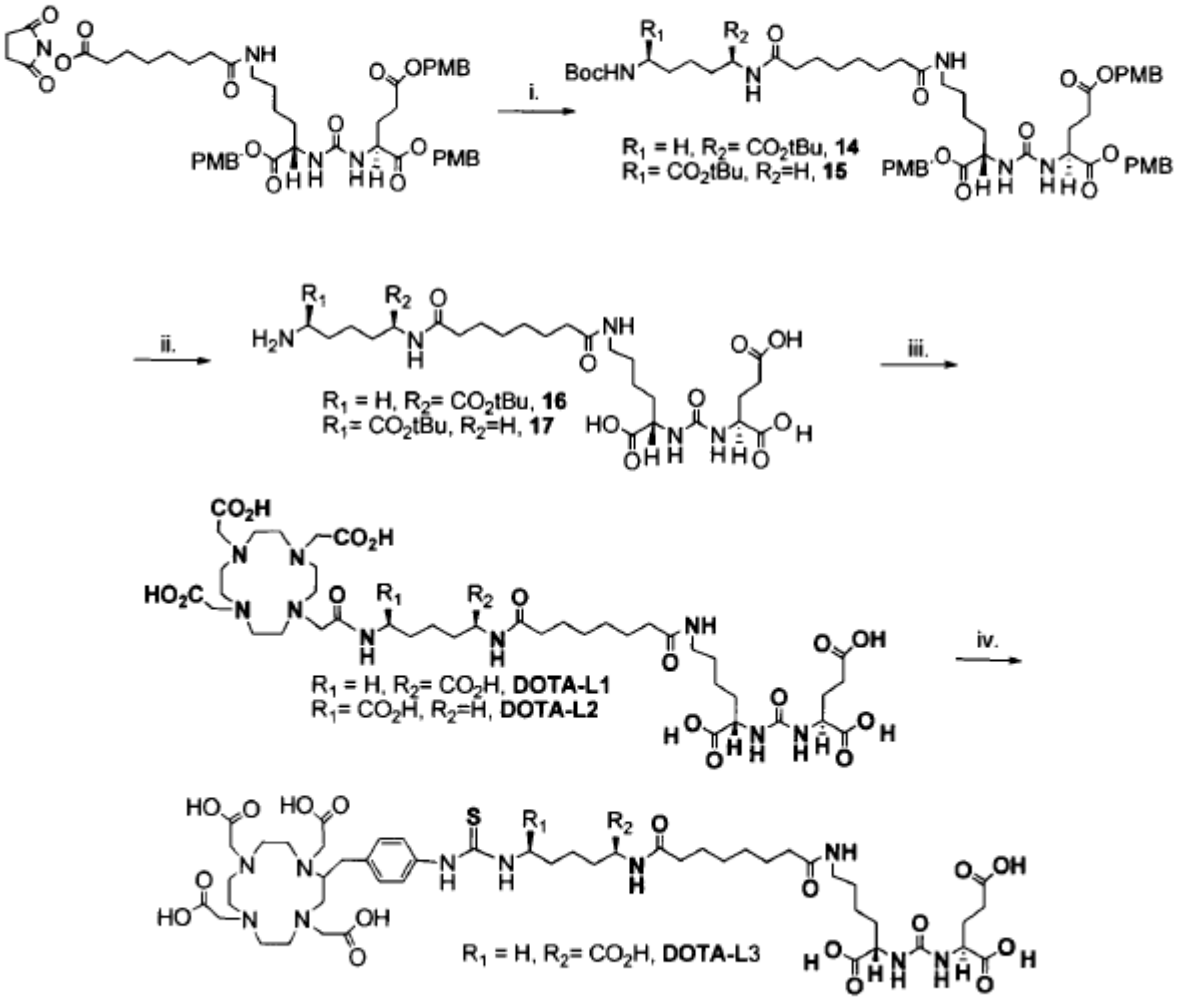


i. $[Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$, pH 7.2, 95°C, 30 min;
ii. $[NEt_4]_2[ReBr_3(CO)_3]$, 90°C, 4h.

Síntesis de los análogos DOTA

Todos los compuestos DOTA-L se prepararon usando el mismo procedimiento general que se muestra en el esquema 7. Se añadió un agente de elongación de la cadena a una solución agitada de un sustrato de material de partida. Se desprotegieron diversos grupos sobre el sustrato recién formado, que luego fue seguido por reacción con un agente DOTA. Los compuestos DOTA se sometieron luego a marcaje con un metal radiactivo para proporcionar el compuesto deseado (Esquema 7).

Esquema 7



i.H-Lys(Boc)-OtBu o Boc-Lys-OtBu, DMF, NEt_3, rt, 16 hr; ii. TFA/CH_2Cl_2, rt, 1h; iii. DOTA-NHS, pH= 7.2, solución reguladora de PBS, 3h, rt; iv. DOTA-Bz-NCS, pH= 9, solución reguladora de borato, 1h, 50°C.

Modelado de L1 en el sitio activo de PSMA. (como referencia)

Para los estudios de modelado molecular de **L1** con PSMA, se usó una estructura cristalina de PSMA recientemente publicada en complejo con (ácido (*S*)-2-(4-yodobencilfosfonometil)-pentanodioico (GPI-18431) (PDB ID: 2C6C) (Mesters, J. R.; et al. Embo J 2006, 25, 1375-1384). Inicialmente, los estudios de acoplamiento se realizaron con **L1** con el sitio activo de 2C6C usando los protocolos CDOCKER basados en CHARMm y LigandFit implementados en Discovery Studio 1.7 (DS 1.7, Accelrys Inc.). Sin embargo, ninguno de ellos produjo poses acopladas en el sitio activo debido al volumen de **L1**. Por lo tanto, se empleó una forma alternativa de dilucidar un posible modo de unión de **L1**. Las estructuras cristalinas de PSMA con varios ligandos, incluyendo GPI-18431, ácido 2-(fosfonometil)pentanodioico (2-PMPA) y glutamato, mostraron que la porción de glutamato de estos compuestos dentro del bolsillo S1' prácticamente se superponen, lo que sugiere que la orientación de la unidad estructural glutamato permanece sin cambios a pesar de una variedad de motivos estructurales al mismo tiempo dentro del bolsillo S1. Eso no fue una sorpresa, ya que se esperaba que la porción de glutamato de **L1** se orientara en el bolsillo S1' de una manera similar a la de los inhibidores conocidos de PSMA (por ejemplo, GPI-18431 y 2-PMPA). En particular, se sabe que el α-carboxilato de glutamato, que interactúa con Arg 210, es esencial para la unión de PSMA (Mlcochova, P.; et al. Febs J 2007, 274, 4731-4741). **L1** se superpuso con GPI-18431 usando cuatro puntos de unión de atadura en glutamato. Las coordenadas de la **L1** superpuesta se transfirieron y se fusionaron en la apoforma de 2C6C, en la que se eliminó el ligando GPI-18431.

La simulación de dinámica molecular del complejo PSMA/**L1** fusionado se realizó con Generalized Born with a simple Switching (GBSW) como un modelo de solvente implícito. Los residuos de aminoácidos dentro de 7Å de **L1** se mantuvieron flexibles, mientras que todos los demás aminoácidos estaban restringidos. La ubicación del ácido carboxílico en la porción de lisina de **L1** cambió dramáticamente e interactuó fuertemente con dos argininas (Arg 534 y Arg 536, Figura 1A) después de la simulación de dinámica molecular, mientras que los dos ácidos carboxílicos del glutamato cambiaron solo ligeramente. El enlazante de tipo lineal de **L1** inicial se ranuró para maximizar la interacción con la región del túnel de PSMA, esto es, el enlazante de tipo lineal flexible de **L1** inicial adoptó una conformación compacta, mejorando de este modo la interacción de **L1** con la región del túnel de PSMA después de simulaciones de dinámica molecular (Figuras 1B). A partir de este modelo PSMA/**L1**, el α-carboxilato de glutamato demostró interacciones de enlace de hidrógeno con Arg 210, Tyr 552 y Tyr 700 y el γ-carboxilato hizo similarmente con Asn 257 y Lys 699. Además, los dos grupos NH de la urea contribuye a la interacción con Gly 518.

Radioquímica. (como referencia)

Se realizó radiomarcación 20 con $[^{99m}Tc(CO)_3(OH_2)_3]^+$ usando el kit Isolink disponible comercialmente a concentraciones de ligando de 10^{-5} M - 10^{-6} M con tiempos de incubación de 30 min a 95 °C. Se produjeron aductos con alto rendimiento radioquímico (> 70 %) y pureza (> 98 %). La formación de los complejos $[^{99m}Tc(CO)_3L]^{+/0}$ (Tc**L1**-Tc**L7**) produjo un cambio significativo en los tiempos de retención de HPLC (a más largos) en comparación con los de los ligandos libres y $[^{99m}Tc(CO)_3(OH_2)_3]^+$, que permite la separación clara de los radiotrazadores.

Propiedades electrónicas de ReL2. (como referencia)

El ligando de bisquinolina **L2** permite la preparación de complejos de núcleo $\{Re(CO)_3\}^+$ fluorescentes isoestructurales y complejos de núcleo radiactivos $(^{99m}Tc(CO)_3)^+$. En consecuencia, se investigaron las propiedades fluorescentes de Re**L2** para determinar si los complejos basados en renio poseen características apropiadas para su uso como sondas biológicas (Stephenson, K. A.; et al. J Am Chem Soc 2004, 126, 8598-8599; James, S.; et al. Bioconjug Chem 2006, 17, 590-596). El espectro electrónico de Re**L2** exhibió absorbancia a 321 nm con un coeficiente de extinción de 17.200 M^{-1}. La excitación de Re**L2** a 321 nm proporciona una emisión de fluorescencia intensa a 550 nm. El gran cambio de Stokes es característico de esta clase de fluoróforo ((Di Bilio, A. J.; et al. JAm Chem Soc 2001, 123, 3181-3182). El pico de emisión se asigna a un estado excitado ^{3}MLCT [$d\pi(Re) \rightarrow \pi^*$(ligando)] sobre la base de estudios espectroscópicos previos de complejos de Re (I) tricarbonilo Di Bilio, A. J.; et al. JAm Chem Soc 2001, 123, 3181-3182; Guo, X. Q.; et al. Anal Chem 1998, 70, 632-637; Guo, X. Q.; et al. Anal Biochem 1997, 254, 179-186; Lo, K. K.; Commun (Camb) 2003, 2704-2705). La vida útil de la fluorescencia para Re**L2** es de 11,8 μs (λ_{em} = 550 nm) en etilenglicol bajo una atmósfera de argón, que es lo suficientemente larga para superar los efectos de la fluorescencia endógena. La autofluorescencia celular puede complicar los estudios de obtención de imágenes in vitro, sin embargo, dado que se produce en la escala de tiempo de nanosegundos, se puede eliminar mediante técnicas de sincronización de tiempo siempre que la sonda bajo investigación tenga una vida útil suficientemente larga. El rendimiento cuántico de fluorescencia de Re**L2** de 0,018 en etilenglicol bajo argón es bajo pero comparable a los reportados para otras sondas de fluorescencia de banda de metal de transición (Lo, K. K.; Commun (Camb) 2003, 2704-2705; Dattelbaum, et al. Bioconjug Chem 2000, 11, 533-536).

Estudios de unión in vitro. (como referencia)

Las afinidades de unión relativas de **L1 - L7** y Re**L1** - Re**L7** se determinaron usando el ensayo de la dipeptidasa ácida N-acetilada-α-unida (NAALADasa) como se describió anteriormente. Los datos se presentan en la tabla 1 (veánse los Ejemplos). Como todos los compuestos poseen el motivo lys-NHCONH-glu, la variación estructural deriva de (a) la longitud del enlazante entre el quelante y el carbono carbonilo de amida unido a la unidad estructural lisina, (b) el quelante, que puede ser cualquiera el bispiridilo, bisquinolina o grupos funcionales mixtos (monopiridil

monocarboxilo), (c) la presencia o ausencia de una segunda función amida entre el quelante y la primera amida - unida a la unidad estructural lisina y (d) la presencia o ausencia de un grupo carboxilo adyacente al quelante, o adyacente al segundo grupo amida (enlazante). Inmediatamente es evidente la necesidad de una longitud de cadena de metileno más larga que la provista por la propia lisina, ya que la versión quelada con Re de **L6** muestra la actividad inhibidora de PSMA más baja de todos los compuestos medidos y no fue capaz de obtener imágenes de los tumores PMSA+. El compuesto L5 demuestra que los enlazantes que contienen siete unidades de metileno entre el nitrógeno quelante y el carbonilo de amida proporcionan compuestos de K_i nanomolar bajo. Los enlazantes más largos también se pueden acomodar fácilmente (**L4** y **L7**). La introducción de renio no causa un cambio constante en la actividad inhibidora, con las versiones marcadas con Re de **L1**, **L4** y **L5** que demuestran actividades inhibidoras más altas que los compuestos no quelados correspondientes. La introducción del núcleo/unidad estructural de Re(CO)3 a los quelantes de esta clase obliga al quelante en una configuración facial, con efectos impredecibles en la unión al sitio activo. La colocación del carboxilato adyacente al quelante (**L3**), en lugar de adyacente al nitrógeno de amida en el enlazante (**L1**) causó un aumento en la actividad inhibidora de más de un orden de magnitud para las versiones no queladas, aunque las versiones marcadas con Re fueron comparables. El quelante de bisquinolina, que es mucho menos polar que el bispiridilo, proporciona una actividad inhibidora de PSMA correspondientemente más fuerte. Reemplazar una de las piridinas con una unidad estructural ácido carboxílico (**L7** a **L4**) provoca un aumento de seis veces en la actividad inhibidora para las moléculas no queladas, pero una disminución de 12 veces en la actividad para los compuestos marcados con Re biológicamente más relevantes.

Biodistribución ex vivo. (como referencia)

Los compuestos [^{99m}Tc] **L1** - **L3** se evaluaron por su farmacocinética ex vivo en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) que portan xenotransplantes PSMA+ PC3 PIP y PSMA-gripe (Chang, S. S.; et al. Cancer Res 1999, 59, 3192-3198; Foss, C. A.; et al. Clin Cancer Res 2005, 11, 4022-4028). Las tablas 2 - 4 (veánse los Ejemplos) muestran el porcentaje de dosis inyectada por gramo (% ID/g) de valores de captación en órganos seleccionados para los compuestos [^{99m}Tc]**L1** - **L3**, respectivamente. El compuesto [^{99m}Tc]**L1** mostró una clara unión dependiente de PSMA en los xenoinjertos de tumores PC3 PIP, alcanzando una captación máxima, entre los tiempos investigados, de 7,87 ± 3,95 % ID/g a 30 min postinyección (p.i.). Las proporciones de captación de tumor de PSMA+ a tumor de PSMA (PIP: gripe) oscilaron entre 23 y 30 minutos p.i. a un máximo de 68 a 300 min p.i.. La distribución dentro de los órganos y tejidos normales también fue favorable con una baja captación de tejido inespecífica y un rápido aclaramiento. La mayor captación no específica observada fue en el bazo a los 30 min p.i. y fue 10,59 ± 6,05 % ID/g, que disminuyó a 1,81 ± 1,10 por 60 min p.i. La captación de riñón, principalmente debido a la alta expresión de PSMA en los túbulos proximales, fue supuestamente alta y alcanzó un pico a 95,66 ± 22,06 % ID/g a 30 min y se aclaró a 1,26 ± 0,67 % de ID/g por 300 min p.i..

El compuesto [^{99m}Tc]**L2** también se ensayó para determinar sus características farmacocinéticas en ratones portadores de tumores, aunque solo a los 30 y 60 min p.i.. La tabla 3 muestra el % de ID/g de captación para este radioligando. En cuanto a [^{99m}Tc]**L1**, [^{99m}Tc]**L2** mostró captación tumoral dependiente de PSMA, que alcanzó su punto máximo a los 60 min p.i. a 2,04 ± 0,25 % ID/g. Eso es significativamente más bajo que la captación observada para [^{99m}Tc]**L1** en el tumor PIP de PC3. Las proporciones PIP: músculo también fueron significativamente más bajas, alcanzando un valor máximo de solo 7,7 a los 60 min p.i. a diferencia de un máximo de 41,4 para [^{99m}Tc]**L1** a 120 min p.i. Se cree que la lipofilicidad añadida de la unidad estructural bisquinolina contribuye a una unión no específica adicional (observe la captación hepática relativamente alta a los 60 min p.i. (1,15 ± 0,33 % ID/g para [^{99m}Tc]**L2** frente a 0,25 ± 0,15 % ID/g para [^{99m}Tc]**L1**), así como la muy alta captación de bazo en ese mismo momento (15,32 ± 6,64 % ID/g)). El bazo aún no había alcanzado el equilibrio durante el transcurso de 60 minutos de este estudio. Captación de riñón a los 60 min p.i. fue 86,0 ± 13,9 % ID/g, similar en valor al observado para [^{99m}Tc]**L1**.

El compuesto [^{99m}Tc]**L3** también demostró una captación tumoral dependiente de PSMA, mostrando la mayor captación de PSMA+ PIP a los 30 min p.i. (11,56 ± 2,86 % ID/g) (Tabla 4). Las proporciones PIP:gripe fueron más altos a los 30 min p.i. a 21,99 y luego se mantuvo estable alrededor de 5: 1 hasta 300 min p.i. En este sentido, tanto [^{99m}Tc]**L2** como [^{99m}Tc]**L3** son inferiores en cuanto a proporciones altas de PIP: gripe, el criterio clave para las imágenes mediadas por PSMA, como comparado con [^{99m}Tc]**L1**. El compuesto [^{99m}Tc]**L3** mostró una tendencia similar en hígado, pulmón y bazo como [^{99m}Tc]**L1** y [^{99m}Tc]**L2**. La captación de radiotrazadores dentro del bazo y el hígado (unión no específica) también fue muy alta para [^{99m}Tc]**L3**. La captación de riñón mediada por PSMA también fue similar a los otros compuestos de esta clase, y alcanzó un máximo de 178,56 ± 35,45 a 60 min p.i.

Metabolismo. (como referencia)

Excepto por el riñón de ratón extraído 60 min postinyección de [^{99m}Tc]**L1**, que contenía el 2 % de su radioactividad extraída como metabolito polar, todos los demás extractos de tejido, plasma y orina a los 30 y 60 min postinyección contenían el 100 %. de la radiactividad analizada por cromatografía como compuesto original.

Microscopía. (como referencia)

La coordinación de la unidad estructural bisquinolina de **L2** con $Re(CO)_3$ hace que este complejo sea fluorescente. En consecuencia, la microscopía se realizó usando Re**L2** en células vivas (Figura 2). Debido a que el cambio de Stokes para Re**L2** es relativamente grande, fue necesario excitar a 494 nm y recoger la fluorescencia de emisión a

628 nm. Los esfuerzos para excitar a 321 nm, donde se esperaba que la eficiencia cuántica para este ligando fuera la más alta, dieron como resultado una autofluorescencia extrema y no hubo datos utilizables. Sin embargo, la excitación en la región verde del espectro condujo a una señal fluorescente débil pero observable desde el interior de las células PIP PSMA+ PC3. Este resultado proporciona una confirmación visual de la internalización de ligandos de bajo peso molecular para PSMA. El mecanismo de internalización de PSMA se ha estudiado previamente, sin embargo, solo se han usado anticuerpos y conjugados de anticuerpos, en lugar de moléculas pequeñas (Rajasekaran, S. A.; et al. Mol Biol Cell 2003, 14, 4835-4845; Moffatt, S.; et al. Gene Ther 2006, 13, 761-772).

Obtención de imágenes

La obtención de imágenes SPECT-CT se llevó a cabo en ratones SCID. Cada ratón tenía un xenoinjerto de PSMA+ PC3 PIP y PSMA-PC3 gripe en los flancos opuestos superiores. Todos los radioligandos se cribaron de esta manera y los resultados obtenidos se utilizaron para determinar si el ensayo de biodistribución ex vivo añadiera información adicional. La figura 3 muestra imágenes tempranas, renderizadas de ratones con radioligandos que demostraron una captación tumoral PIP positiva. Los ratones se inyectaron por vía intravenosa con 0,5-1 mCi (19-37 MBq) del compuesto marcado con ^{99m}Tc correspondiente y se tomaron imágenes a los 45 min p.i.. Los radioligandos con éxito permitieron la visualización tanto del tumor PIP como de los riñones, cada uno de los cuales expresa PSMA. Los compuestos [^{99m}Tc]**L1** - **L4** produjeron exploraciones positivas con características distintivas. El compuesto [^{99m}Tc]**L1** mostró un tumor PIP fuertemente positivo, captación de la vesícula biliar y una clara visualización de los riñones. El compuesto [^{99m}Tc]**L2** mostró una débil captación del tumor PIP, una fuerte captación de la vesícula biliar y una captación renal. El compuesto [^{99m}Tc]**L3** mostró una fuerte captación de tumor PIP, a pesar del pequeño tamaño del tumor, la captación de la vesícula biliar y la visualización clara de los riñones. El compuesto [^{99m}Tc]**L4** mostró una elevada captación de tumor PIP, así como una alta captación de hígado y riñón. Las imágenes obtenidas varias horas después de la inyección de [^{99m}Tc]**L1** o [^{99m}Tc]**L3** demostraron un mayor contraste del tumor con respecto al fondo (Figura 4), con muy poca radioactividad evidente fuera del tumor para [^{99m}Tc]**L1**. El compuesto [^{99m}Tc]**L5** produjo imágenes cualitativamente similares a [^{99m}Tc]**L4**.

Como prueba adicional de la especificidad de unión in vivo, realizamos un estudio de bloqueo usando [^{99m}Tc]**L1** en un modelo de tumor de próstata LNCaP (PSMA+), pero primero pretratamos al animal con 50 mg/kg del potente inhibidor selectivo de PSMA, ácido 2-(fosfonometil)pentanodioico (PMPA). La figura 5 muestra que el PMPA es capaz de eliminar la unión de [^{99m}Tc]**L1** no solo al tumor, sino también a la corteza renal, otro sitio de unión específica para radiofármacos de esta clase. Estos resultados proporcionan una verificación más de la selectividad de unión in vivo, usando un agente bloqueante de una clase química diferente a la de los inhibidores basados en la urea, y en un tumor de próstata PSMA+ diferente y bien establecido.

A pesar de los avances que utilizan una variedad de modalidades de obtención de imágenes, especialmente la espectroscopia de MR, la obtención de imágenes molecular clínicamente viable de PCa se ha mantenido esquiva. La FDG-PET, que ha funcionado tan bien no solo en la identificación de tumores primarios y metastásicos, sino también en la monitorización terapéutica, ha fracasado en gran medida en el caso de la PCa, tal vez debido a la tasa relativamente baja de metabolismo de estos tumores en comparación con otros cánceres epiteliales. Aunque la reconstrucción iterativa con el coregistro anatómico puede mejorar la obtención de imágenes ProstaScint™, y el uso de una versión radiomarcada del anticuerpo monoclonal humano J591 contra un epítopo extracelular de PSMA parece ser prometedor, estos agentes estarán cargados con las mismas desventajas de todos los anticuerpos intactos para la obtención de imágenes, a saber, aclaramiento lento a partir de la sangre y sitios inespecíficos. Sin embargo, estos anticuerpos se unen a lo que consideramos un objetivo ideal para la obtención de imágenes y la terapia PSMA del cáncer de próstata.

Los radiofármacos descritos por la invención en este documento forman parte de una serie de nuevos agentes para la obtención de imágenes basados en PSMA de bajo peso molecular. Se ha demostrado previamente la unión específica de ureas adecuadamente funcionalizadas a PSMA, para la obtención de imágenes con SPECT y PET. Sin embargo, esos agentes fueron radiomarcados con cualquiera ^{125}I, ^{11}C o ^{18}F Foss, C. A.; et al. Clin Cancer Res 2005, 11, 4022-4028; Pomper, M. G.; et al. Mol Imaging 2002, 1, 96-101; Mease R.C. et al. Clin Cancer Res. 2008, 14, 3036-3043). Los agentes marcados con yodo-125 se pueden usar junto con dispositivos de obtención de imágenes de animales pequeños de alta resolución para estudiar modelos experimentales y el isótopo se puede cambiar a ^{123}I o ^{124}I para SPECT o PET humano, respectivamente. Sin embargo, esos isótopos son caros ($ 1.000/mCi para [^{124}I] NaI) y pueden ser difíciles de obtener en poco tiempo. El Carbon-11 es en gran parte un radionúclido experimental para uso solo en centros que tienen un ciclotrón interno. Los radiofármacos marcados con flúor-18 se pueden enviar a distancias limitadas, pero esos compuestos serán de radioactividad específica relativamente baja al llegar al sitio de uso. El flúor-18 también requiere un ciclotrón para la producción. Por estas razones, la disponibilidad inmediata (a través de generadores entregados a los departamentos de medicina nuclear diariamente) y las características de obtención de imágenes ideales de ^{99m}Tc, se han acometido en un programa para sintetizar agentes para la obtención de imágenes basados en PSMA marcados con ^{99m}Tc. Se encontró que usando la tecnología SAAC, ^{99m}Tc se puede incorporar fácilmente de una manera estéricamente discreta a estas ureas de unión a PSMA. Debido a que Tc no tiene isótopos estables, se usa el grupo VIIB congénere Re para los estudios inhibidores de PSMA.

Se sintetizaron diversos compuestos, designados **L1**-L7 (no según la invención), tanto en sus formas marcadas con Re y ^{99m}Tc. Estos siete compuestos se derivan de DCL, con diferentes enlazantes entre la ε amina de la lisina y el quelante. Usando la tecnología SAAC, se generaron tres quelantes diferentes, a saber, el bispiridilo, la bisquinolina y el monopiril-monoácido. La razón principal para el uso de estos diferentes quelantes fue la explotación de sus diferentes grados de volumen estérico y lipofilia. Tanto **L1** como **L2** proporcionan complejos catiónicos tras la formación del complejo con el núcleo organometálico $^{99m}Tc(CO)_3/Re(CO)_3$. Por otro lado, **L4** ofrece un complejo neutro para el núcleo de tricarbonilo metálico. El compuesto **L2** proporciona el agente más lipófilo (Tabla 1). Ese grado de lipofilicidad tuvo un efecto significativo tanto en la unión in vitro como en la obtención de imágenes in vivo, con Re**L2** demostrando una actividad inhibidora de PSMA 20 veces mayor que Re**L1**, pero PIP:gripe seis veces menor a 1 hora postinyección y significativamente más captación de hígado y bazo para el análogo de ^{99m}Tc (Tabla 1, Figura 3). Los tumores de PIP y gripe se derivan de células de cáncer de próstata humano PC3 que difieren solo en su expresión de PSMA (PIP = PSMA+, gripe = PSMA$^-$). Otra forma de alterar la lipofilicidad de estos complejos es introducir una unidad estructural ácido carboxílico en varias posiciones en el enlazante. El traslado del ácido carboxílico enlazante al carbono adyacente al nitrógeno quelante provocó que la afinidad de unión disminuyera (Re**L3**), y proporcionara una PIP: gripe menor y una mayor captación de hígado y bazo que el compuesto [^{99m}Tc] **L1** (Figura 3). En esta serie de tres compuestos, [^{99m}Tc] **L1** tiene las mejores propiedades para la obtención de imágenes in vivo, a pesar de su potencia inhibidora de PSMA relativamente baja.

Los compuestos Re**L4** y Re**L7** permiten la comparación de los quelantes de bispiridilo y monopiridilo monoácido, respectivamente. El compuesto Re**L4** tenía una potencia inhibidora de PSMA de aproximadamente 12 veces más alta que la de Re**L7**. Aunque los ensayos de biodistribución ex vivo no se realizaron para estos dos compuestos, [^{99m}Tc]**L4** demostró una fuerte captación en PIP en oposición a los tumores de la gripe, pero también hubo una captación significativa dentro del hígado, una característica de imagen indeseable tal vez debido a la mayor lipofilia de este compuesto con respecto a [^{99m}Tc]**L1** y [^{99m}Tc]**L3**, que tienen una longitud de enlazante ligeramente más corta e incorporan una unidad estructural ácido de enlazante (Figura 3). El compuesto [^{99m}Tc]**L7** no demostró evidencia de captación específica del tumor PIP y mostró solo radioactividad dentro del hígado.

El compuesto **L5** no tiene amida o ácido carboxílico dentro del enlazante y **L6** tiene el bispiridilo incorporado en la ε amina de lisina. La cadena de enlazante de **L5** es seis carbonos más corta que la de la serie **L1**-**L3**. El compuesto Re**L6** demostró una actividad inhibidora de PSMA muy baja, la más baja de toda la serie, y [^{99m}Tc]**L6** no mostró captación específica de tumor PIP.

En esta serie [^{99m}Tc] **L1** y Re**L2** han surgido como una utilidad para la obtención de imágenes del cáncer de próstata in vivo e in vitro, respectivamente. El compuesto [^{99m}Tc]**L1** es un candidato clínico prometedor debido a su accesibilidad sintética, proporción objetivo a no-objetivo muy alta (PIP:gripe = 44:1 a las 2 h postinyecciones), cinética de lavado rápido, estabilidad metabólica y las muchas características saludables de ^{99m}Tc discutidas anteriormente. La indicación inicial para su uso sería estudiar pacientes que se hayan sometido a una prostatectomía en los que se detecte un antígeno específico de la próstata en aumento (PSA), la misma indicación que para ProstaScint™. El compuesto Re**L2** ha documentado la internalización de PSMA después de la unión de un agente de bajo peso molecular al sitio activo (Figura 2). Este compuesto se podría usar para estudiar la cinética de la internalización de PSMA. La internalización de compuestos de esta clase sugiere el desarrollo de los análogos radioterapéuticos correspondientes.

Descripción química y terminología

Los compuestos descritos en este documento pueden tener uno o más centros o planos asimétricos. Los compuestos de la presente invención que contienen un átomo sustituido asimétricamente se pueden aislar en formas ópticamente activas o racémicas. Es bien conocido en la técnica cómo preparar formas ópticamente activas, tal como por resolución de formas racémicas (racematos), por síntesis asimétrica, o por síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos. La resolución de los racematos se puede lograr, por ejemplo, mediante procedimientos convencionales tales como la cristalización en presencia de un agente de resolución, o cromatografía, usando, por ejemplo, una columna de HPLC quiral. Muchos isómeros geométricos de olefinas, dobles enlaces C = N, y similares también pueden estar presentes en los compuestos descritos en este documento, y todos estos isómeros estables están contemplados en la presente invención. Los isómeros geométricos cis y trans de los compuestos de la presente invención se describen y se pueden aislar como una mezcla de isómeros o como formas isómeras separadas. Todas las formas quirales (enantioméricas y diastereoméricas) y racémicas, así como todas las formas geométricas isoméricas de una estructura, se pretenden a menos que se indique específicamente la estereoquímica específica o la forma isomérica.

Cuando cualquier variable ocurre más de una vez en cualquier constituyente o fórmula para un compuesto, su definición en cada aparición es independiente de su definición en cada otra aparición. Así, por ejemplo, si se muestra que un grupo está sustituido con 0-2 R*, dicho grupo puede estar opcionalmente sustituido con hasta dos grupos R* y R* en cada aparición se selecciona independientemente de la definición de R*. Además, las combinaciones de sustituyentes y/o variables son permisibles solo si tales combinaciones dan como resultado compuestos estables.

Como se indicó anteriormente, diversos sustituyentes de las diversas fórmulas están "opcionalmente sustituidos". El término "sustituido", como se usa en este documento, significa que uno o más hidrógenos en el átomo o grupo designado se reemplazan con una selección del grupo de sustituyentes indicado, siempre que no se exceda la valencia normal del átomo designado, y que la sustitución resulta en un compuesto estable. Cuando un sustituyente es oxo (ceto, esto es, = O), entonces se reemplazan 2 hidrógenos en un átomo. La presente invención pretende incluir todos los isótopos (incluidos los radioisótopos) de los átomos que aparecen en los presentes compuestos.

Cuando están más sustituidos, pueden estar así sustituidos en una o más posiciones disponibles, por lo general 1 a 3 o 4 posiciones, por uno o más grupos apropiados como se define en las reivindicaciones. La presente descripción describe además grupos "sustituidos". incluyendo, por ejemplo, halógeno; ciano hidroxilo; nitro; azido; alcanoilo (tal como un grupo alcanoílo C_{1-6} tal como acilo o similares); carboxamido; grupos alquilo (incluidos los grupos cicloalquilo, que tienen de 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono); grupos alquenilo y alquinilo (incluidos los grupos que tienen uno o más enlaces insaturados y desde 2 a aproximadamente 8, preferiblemente 2, 3, 4, 5 o 6, átomos de carbono); grupos alcoxi que tienen uno o más enlaces de oxígeno y desde 1 a aproximadamente 8, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono; ariloxi tal como fenoxi; grupos alquiltio que incluyen aquellos que tienen uno o más enlaces tioéter y desde 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono; grupos alquilsulfinilo que incluyen aquellos que tienen uno o más enlaces sulfinilo y desde 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono; grupos alquilsulfonilo que incluyen aquellos que tienen uno o más enlaces sulfonilo y desde 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono; grupos aminoalquilo que incluyen grupos que tienen uno o más átomos de N y desde 1 a aproximadamente 8, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5 o 6, átomos de carbono; arilo carbocíclico que tiene 6 o más carbonos y uno o más anillos (por ejemplo, fenilo, bifenilo, naftilo o similares, cada anillo aromático ya sea sustituido o no sustituido); arilalquilo que tiene de 1 a 3 anillos separados o fusionados y desde 6 a aproximadamente 18 átomos de carbono del anillo, siendo el bencilo un grupo arilalquilo preferido; arilalcoxi que tiene de 1 a 3 anillos separados o fusionados y desde 6 a aproximadamente 18 átomos de carbono del anillo, siendo O-bencilo un grupo arilalcoxi preferido; o un grupo heterocíclico saturado, insaturado o aromático que tiene de 1 a 3 anillos separados o fusionados con 3 a aproximadamente 8 miembros por anillo y uno o más átomos de N, O o S, por ejemplo coumarinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinazolinilo, piridilo, pirazinilo, pirimidilo, furanilo, pirrolilo, tienilo, tiazolilo, triazinilo, oxazolilo, isoxazolilo, imidazolilo, indolilo, benzofuranilo, benzotiazolilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, piperidinilo, morfolinilo, piperazinilo, y pirrolidinilo. Tales grupos heterocíclicos pueden estar sustituidos adicionalmente, por ejemplo, con hidroxi, alquilo, alcoxi, halógeno y amino.

Como se usa en este documento, "alquilo" pretende incluir grupos hidrocarbonados alifáticos saturados tanto de cadena ramificada como lineal, que tienen el número especificado de átomos de carbono. Los ejemplos de alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, s-butilo, t-butilo, n-pentilo y s-pentilo. Los grupos alquilo preferidos son grupos alquilo C_{1-6}. Los grupos alquilo especialmente preferidos son metilo, etilo, propilo, butilo y 3-pentilo. El término alquilo C_{1-4} como se usa en este documento incluye grupos alquilo que consisten en 1 a 4 átomos de carbono, que pueden contener una unidad estructural ciclopropilo. Ejemplos apropiados son metilo, etilo y ciclopropilmetilo.

Se pretende que "cicloalquilo" incluya grupos de anillos saturados, que tienen el número especificado de átomos de carbono, tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo. Los grupos cicloalquilo por lo general tendrán de 3 a aproximadamente 8 miembros de anillo.

En el término "(cicloalquilo C_{3-8}) alquilo C_{1-4}", cicloalquilo y alquilo son como se han definido anteriormente, y el punto de unión está en el grupo alquilo. Este término abarca, pero no se limita a, ciclopropilmetilo, ciclohexilmetilo y ciclohexilmetilo.

Se entiende que "alquenilo" incluye cadenas de hidrocarburos ya sea de configuración lineal o ramificada que comprenden uno o más enlaces carbono-carbono insaturados, que pueden aparecer en cualquier punto estable a lo largo de la cadena, tal como etenilo y propenilo. Los grupos alquenilo tendrán por lo general de 2 a aproximadamente 8 átomos de carbono, por lo general más de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono.

Se entiende que "alquinilo" incluye cadenas de hidrocarburos ya sea de configuración lineal o ramificada que comprenden uno o más enlaces triples carbono-carbono, que pueden aparecer en cualquier punto estable a lo largo de la cadena, como etinilo y propinilo. Los grupos alquinilo por lo general tendrán de 2 a aproximadamente 8 átomos de carbono, por lo general más de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono.

"Haloalquilo" pretende incluir grupos hidrocarbonados alifáticos saturados tanto de cadena lineal como ramificada que tienen el número especificado de átomos de carbono, sustituidos con 1 o más átomos de halógeno. Los ejemplos de haloalquilo incluyen, pero no se limitan a, mono-, di- o tri-fluorometilo, mono-, di- o triclorometilo, mono-, di-, tri-, tetra- o pentafluoroetilo, y mono -, di-, tri-, tetra- o penta-cloroetilo. Los grupos haloalquilo típicos tendrán de 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono, por lo general más de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono.

El "alcoxi" representa un grupo alquilo como se define anteriormente con el número indicado de átomos de carbono unidos a través de un puente de oxígeno. Los ejemplos de alcoxi incluyen, pero no se limitan a, metoxi, etoxi, n-

propoxi, i-propoxi, n-butoxi, 2-butoxi, t-butoxi, n-pentoxi, 2-pentoxi, 3-pentoxi, isopentoxi, neopentoxi, n-hexoxi, 2-hexoxi, 3-hexoxi y 3-metilpentoxi. Los grupos alcoxi tienen por lo general de 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono, por lo general más de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono.

"Halolcoxi" representa un grupo haloalquilo como se define anteriormente con el número indicado de átomos de carbono unidos a través de un puente de oxígeno.

Como se usa en este documento, el término alquiltio incluye aquellos grupos que tienen uno o más enlaces tioéter y preferiblemente desde 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono, por lo general más de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono.

Como se usa en este documento, el término "alquilsulfinilo" incluye aquellos grupos que tienen uno o más grupos de enlace sulfóxido (SO) y por lo general desde 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono, por lo general más de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono.

Como se usa en este documento, el término "alquilsulfonilo" incluye aquellos grupos que tienen uno o más grupos de enlace sulfonilo (SO_2) y por lo general desde 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono, por lo general más de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono.

Como se usa en este documento, el término "alquilamino" incluye aquellos grupos que tienen uno o más grupos de aminas primarias, secundarias y/o terciarias y por lo general desde 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono, por lo general más de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono.

"Halo" o "halógeno", como se usa en este documento, se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo; y "contraión" se usa para representar una pequeña especie cargada negativamente, tal como cloruro, bromuro, hidróxido, acetato, sulfato y similares.

Como se usa en este documento, "grupo carbocíclico" pretende significar cualquier grupo estable de 3 a 7 miembros monocíclico o bicíclico o tricíclico o bicíclico de 7 a 13 miembros, cualquiera de los cuales puede ser saturado, parcialmente insaturado o aromático. Además de los ejemplificados en otra parte en este documento, los ejemplos de tales carbociclos incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, adamantilo, ciclooctilo, [3.3.0]biciclooctanilo, [4.3.0]biciclononanilo, [4.4.0]biciclodecanilo, [2.2.2]biciclooctanilo, fluorenilo, fenilo, naftilo, indanilo y tetrahidronaftilo.

Como se usa en este documento, el término "grupo heterocíclico" pretende incluir grupos saturados, parcialmente insaturados o insaturados (aromáticos) que tienen de 1 a 3 anillos (preferiblemente fusionados) con 3 a aproximadamente 8 miembros por anillo, al menos un anillo que contiene un átomo seleccionado de N, O o S. Los heteroátomos de nitrógeno y azufre se pueden oxidar opcionalmente. El término o "heterocicloalquilo" se usa para referirse a grupos heterocíclicos saturados.

El anillo heterocíclico se puede unir a su grupo colgante en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado una estructura estable. Los anillos heterocíclicos descritos en este documento pueden estar sustituidos en carbono o en un átomo de nitrógeno si el compuesto resultante es estable. Un nitrógeno en el heterociclo opcionalmente se puede cuaternizar. Como se usa en este documento, el término "sistema heterocíclico aromático" pretende incluir cualquier sistema de anillo aromático heterocíclico estable monocíclico de 5 a 7 miembros o bicíclico de 10 a 14 miembros que comprenda átomos de carbono y desde 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente del grupo que consiste en N, O y S. Se prefiere que el número total de átomos de S y O en el heterociclo aromático no sea más de 2, más preferiblemente no más de 1.

Los ejemplos de heterociclos incluyen, pero no se limitan a, los ejemplificados en otra parte en este documento y además incluir acridinilo, azocinilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, benzotiofuranilo, benzotiofenilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, benzotriazolilo, benzotetrazolilo, bencisoxazolilo, bencisotiazolilo, bencimidazolinilo, carbazolilo, NH-carbazolilo, carbolinilo, cromanilo, cromenilo, cinolinilo, decahidroquinolinilo, 2*H*,6*H*-1,5,2-ditiazinilo, dihidrofuro[2,3-*b*]tetrahidrofurano, furanilo, furazanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, imidazolilo, 1H-indazolilo, indolenilo, indolinilo, indolizinilo, indolilo, 3*H*-indolilo, isobenzofuranilo, isocromanilo, isoindazolilo, isoindolinilo, isoindolilo, isoquinolinilo, isotiazolilo, isoxazolilo, morfolinilo, naftiridinilo, octahidroisoquinolinilo, oxadiazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo;- 1,2,5oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, oxazolidinilo, oxazolilo, oxazolidinilo, pirimidinilo, fenantridinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxatiinilo, fenoxazinilo, ftalazinilo, piperazinilo, piperidinilo, pteridinilo, purinilo, piranilo, pirazinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridooxazol, piridoimidazol, piridotiazol, piridinilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolidinilo, pirrolinilo, 2*H*-pirrolilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolinilo, 4H-quinolizinilo, quinoxalinilo, quinuclidinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidroisoquinolinilo, tetrahidroquinolinilo, 6*H*-1,2,5-tiadiazinilo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, 1,2,5-tiadiazolilo, 1,3,4tiadiazolilo, tiantrenilo, tiazolilo, tienilo, tienotiazolilo, tienooxazolilo, tienoimidazolilo, tiofenilo, triazinilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, 1,2,5-triazolilo, 1,3,4-triazolilo, y xantenilo.

Los grupos heterocíclicos preferidos incluyen, pero no se limitan a, piridinilo, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, pirrolidinilo, morfolinilo, piperidinilo, piperazinilo e imidazolilo. También se incluyen compuestos de anillo fusionado y espiro que contienen, por ejemplo, los heterociclos anteriores.

Como se usa en este documento, el término "arilo carbocíclico" incluye grupos que contienen de 1 a 3 anillos separados o fusionados y desde 6 a aproximadamente 18 átomos de anillo, sin heteroátomos como miembros de anillo. Los grupos arilo carbocíclicos específicamente preferidos incluyen fenilo y naftilo que incluyen 1-naftilo y 2-naftilo.

Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a una solución biocompatible, teniendo debidamente en cuenta la esterilidad, el pH, la isotonicidad, la estabilidad y similares, y puede incluir cualquiera y todos los solventes, diluyentes (incluidos la solución salina estéril, la inyección de cloruro de sodio, la inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro de sodio, inyección de Ringer lactato y otras soluciones reguladoras acuosas, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y similares. El portador farmacéuticamente aceptable también puede contener estabilizantes, conservantes, antioxidantes u otros aditivos, que son bien conocidos por un experto en el arte, u otro vehículo como se conoce en la técnica.

Como se usa en este documento, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos en los que el compuesto original se modifica haciendo sales de ácido o base no tóxicas de los mismos. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto original formado, por ejemplo, a partir de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Por ejemplo, las sales de ácidos no tóxicos convencionales incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maléfico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, mesílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etano disulfónico, oxálico, isetiónico, HOOC-$(CH_2)_n$-COOH donde n es 0-4, y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir de un compuesto original que contiene una unidad estructural básica o ácida por procedimientos químicos convencionales. Generalmente, tales sales se pueden preparar haciendo reaccionar formas ácidas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada (como hidróxido, carbonato, bicarbonato de Na, Ca, Mg o K o similares), o haciendo reaccionar formas de base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Tales reacciones se llevan a cabo por lo general en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los dos. En general, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo, cuando sea posible. Se pueden encontrar listas de sales apropiadas adicionales, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, p. 1418 (1985).

La invención y la manera y el proceso de hacerla y usarla se describen ahora en términos tan completos, claros, concisos y exactos que permitan a cualquier persona experta en el arte a la que pertenece, hacer y usar la misma. Para señalar particularmente y reclamar claramente el tema considerado como invención, las siguientes reivindicaciones concluyen esta especificación.

Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera. La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura.

Procedimientos generales. Todas las reacciones se realizaron bajo una atmósfera de nitrógeno, a menos que se indique lo contrario. Los solventes y productos químicos obtenidos de fuentes comerciales fueron de grado analítico o mejor y se utilizaron sin purificación adicional. Todos los experimentos se realizaron por duplicado o por triplicado para garantizar la reproducibilidad. La cromatografía analítica de capa fina (TLC) se realizó con gel de sílice Z19 de 0,2 mm soportada en aluminio Aldrich, placas 329-1 y se visualizó con luz ultravioleta (254 nm), I_2 y ninhidrina al 1 % en EtOH. La cromatografía instantánea se realizó usando gel de sílice comprado de Bodman (Aston PA), MP SiliTech 32-63 D 60Å. En la mayoría de los casos, el aislamiento del producto consistió en eliminar el solvente de la mezcla de reacción, extraer con un solvente orgánico, lavar con agua y salmuera, secar con sulfato de sodio anhidro, filtrar y concentrar el filtrado. El uso de tales condiciones de tratamiento se indicará con la frase "aislamiento del producto" (que se sigue, entre paréntesis, por el solvente de extracción). La purificación en la mayoría de los casos se logró mediante cromatografía instantánea y se indica con el término "cromatografía instantánea" (que se sigue, entre paréntesis, por el solvente de elución usado). Los puntos de fusión se midieron usando un aparato Mel-Temp y no están corregidos. Los espectros de ^1H RMN se registraron en un espectrómetro ya sea Varian Mercury 400 MHz o Bruker ultrashield™ 400 MHz. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en ppm campo abajo por referencia a las resonancias de protones que resultan de la deuteración incompleta del solvente de RMN. Los

espectros de masas ESI de baja resolución se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus. Los espectros de masas FAB de resolución más alta se obtuvieron en un espectrómetro de masas JOEL JMS-AX505HA en la instalación del espectrómetro de masas en la Universidad de Notre Dame. La rotación óptica se midió en un polarímetro Jasco P-1010. Los espectros de infrarrojos se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Tensor 27. Se realizó una purificación por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de **L1**-**L7** y Re**L1**-Re**L7** usando una columna Phenomenex C_{18} Luna 10 X 250 mm^2 en un sistema LC Waters 600E Delta con un detector UV/UV de absorbancia ajustable Waters 486, ambos controlados por el software Empower. La purificación de Re**L1**-**L7** y [^{99m}Tc] **L1-L7** por HPLC se realizó mediante las siguientes condiciones isocráticas: Procedimiento 1, la fase móvil era un 65 % de solvente A (0,1 % de TFA en agua) y un 35 % de solvente B (0,1 % de TFA en CH3CN), velocidad de flujo 2 ml/min; Procedimiento 2, la fase móvil era un 65 % de solvente A y un 35 % de solvente B, velocidad de flujo de 4 ml/min; Procedimiento 3, la fase móvil era 70 % de solvente A y 30 % de solvente B, velocidad de flujo 2 ml/min. El eluyente se controló a 254 nm y 220 nm. Para la purificación radiosintética, la HPLC se realizó con un sistema de HPLC Waters Chromatography Division equipado con dos bombas modelo 510EF, un controlador de gradiente automático modelo 680, un detector de absorbancia UV modelo 490 y un detector de centelleo Bioscan NaI conectado a un sistema Bioscan Flow-count. La salida del detector UV y el sistema de radiodetector Flow-count se alimentaron a un ordenador Gateway 2000 P5-133 equipado con una tarjeta de ordenador IN/US System, Inc. y se analizaron usando el software Winflow (IN/US). Los espectros de absorción se recogieron usando un espectrofotómetro Hewlett-Packard 8453. El kit Isolink fue un generoso regalo de Mallinckrodt-Tyco Health Care (St. Louis, MO, USA).

Ejemplo 1: Síntesis de intermedios

Éster 4-metoxi-bencílico del ácido 2-amino-6-tert-butoxicarbonilamino-hexanoico (2).

El compuesto **2** se preparó en dos etapas. En un matraz de fondo redondo de tres bocas, secado a la llama, de 250 ml, bajo nitrógeno, se colocó N_ε-Boc-N_α-Fmoc-L-lisina (7,0 g, 15 mmol) y 60 ml de DMF seco. A esto se le añadió carbonato de cesio (7 g, 21 mmol) y cloruro de 4-metoxibencilo (2,5 g, 16 mmol). La suspensión se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 4 h, luego se filtró y se lavó con acetato de etilo. El aislamiento del producto (EtOAc, Na_2CO_3 al 5 %, agua, Na_2SO_4) seguido de recristalización en 60/40 (v/v) de hexano/EtOAc dio 2 cultivos de un sólido incoloro. pf 118-120 °C. TLC R_f = 0,33 (70/30 de hexano/EtOAc). Rendimiento: 8,22 g,14 mmol, 93,43 %. ^{1}H RMN($CDCl_3$) δ: 7,75(d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,55(d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,38(t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,32-7,20(m, 4H), 6,85-6,80(m, 2H), 5,4(d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 5,18-5,00(m, 2H), 4,44-4,38(m, 3H), 4,17(t, *J* = 6,0 Hz 1H), 3,80-3,70(m, 4H), 3,00(m, 2H), 1,90-1,11(m, 15H). ESIMS *m*/*z:* 588,40 $[M+1]^+$.

En un matraz de fondo redondo secado a la llama, se colocaron 5,0 g (8,54 mmol) del análogo totalmente protegido de **2**. Se disolvió en 60 ml de una solución al 20 % de piperidina en DMF. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El aislamiento del producto (CH_2Cl_2, agua, Na_2SO_4) seguido de cromatografía instantánea (4/96 MeOH/$CHCl_3$) proporcionó un 2 puro como un aceite (2,59 g, 7,07 mmol) con un rendimiento del 83 %. (TLC R_f = 0,42 en 5/95 MeOH/CH_2Cl_2). ^{1}H RMN ($CDCl_3$) δ: 7,29 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 6,90 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 5,09 (m, 2H), 4,44-4,24 (m, 1H), 3,83 (s, 3H), 2,76-58 (m, 3H), 2,11-1,34 (m, 16H). ESIMS *m*/*z*: 367[M+1]+ para $C_{19}H_{31}N_2O_5$.

2- {3- [1-p-metoxibencilcarboxilato- (5-t-butilcarbamilpentil)] - ureido} -di-p-metoxibencil pentanodioato (3).

Se colocó bis-4-metoxibencil-L-glutamato HCl **4** (3,6 g, 8,5 mmol) en un matraz de fondo redondo de 3 bocas secado con llama bajo nitrógeno y se disolvió en 15 ml de CH_2Cl_2. Se colocó trifosgeno (0,833 g, 2,8 mmol) en un vial, se disolvió en 3 ml de CH_2Cl_2 y se añadió al matraz de tres bocas. El matraz se enfrió a -77 ºC (lechada de etanol en hielo seco) bajo nitrógeno. A esto se le añadió lentamente trietilamina (12 ml, 85 mmol en 10 ml de CH_2Cl_2). La mezcla de reacción se agitó a -77 ºC, durante 1 h, se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 30 min a rt. A esto se le añadió el compuesto **2** (3,1 g, 8,5 mmol en 7 ml de CH_2Cl_2). La mezcla resultante se agitó durante la noche. El aislamiento del producto (CH_2Cl_2, agua, NaCl, Na_2SO_4) seguido de cromatografía instantánea (20/80 EtOAc/CH_2Cl_2) proporcionó un aceite que solidificó al reposar. Rendimiento: 4,135 g, 5,3 mmol, 62,3 %. TLC R_f = 0,47 (20/80 EtOAc/CH_2Cl_2). ^{1}H RMN ($CDCl_3$) δ: 7,26-7,2 (m, 6H), 6,86-6,80 (m, 6H), 5,89(m, 2H), 5,12-5,0 (m, 6H), 4,51 (m, 1H), 4,45 (m, 1H), 3,77 (s, 9H), 2,98 (m, 2H), 2,36 (m, 2H), 2,12 (m, 1H), 1,92 (m, 1H), 1,70 (m, 1H), 1,58 (m, 1H), 1,4 (m, 11H), 1,24 (m, 3H); ESIMS *m*/*z* : 780 [M+1]+, HRFAB+-MS: Calculado para $C_{41}H_{54}N_3O_{12}$, 780,3679, $[M+1]^+$, observado 780,3685 $[M+1]^+$; $^{25}[\alpha]_D$ = -3,440 (0,12, DMF).

Sal de p-toluensulfonato de 2-{3-[1-p-metoxibencilcarboxilato-(5-aminopentil)]-ureido}-di-p-metoxibencil pentanodioato, (5).

Una solución de **3** (2 g, 2,6 mmol) disuelta en 20 ml de EtOAc se enfrió a 0-2 °C en un baño de hielo y monohidrato de ácido p-toluenosulfónico (0,49 g, 2,6 mmol) en 5 ml de etanol absoluto se añadió. El baño de enfriamiento se retiró y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró luego hasta obtener un aceite espeso a presión reducida y la mezcla se purificó con cromatografía instantánea usando 10/90 de MeOH/CH_2Cl_2 para proporcionar el producto como sólido incoloro con un rendimiento del 45 % (0,98 g, 1,15 mmol). TLC R_f = 0,47 (MeOH/CH_2Cl_2 10/90). ^{1}H RMN ($CDCl_3$) δ: 7,68 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,66-7,57 (s, ancho, 3H), 7,22-7,13 (m, 6H), 7,0 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 6,84-6,76 (m, 6H), 6,34 (s ancho, 2H), 5,06-4,88 (m,

6H), 4,44 (m, 1H), 4,32 (m, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,73 (s, 6H), 2,86 (s, ancho, 2H), 2,3-2,24 (singlete en la parte superior del multiplete, 5H), 2,08-1,99 (m, 1H), 1,82-1,72 (m, 1H), 1,64-1,3 (m, 6H); ESIMS m/z: 680 [M^++1], HRFAB$^+$- MS: Calculado para $C_{36}H_{46}N_3O_{10}$, 680,3178 [M^+], encontrado: 680,3177.

2-{3-[1-p-Metoxibencilcarboxilato-(5-aminopentil)]-ureido}-di-p-metoxibencil pentanodioato (1).

Se colocó una solución de **5** (0,15 g, 0,17 mmol en 50 ml de CH_2Cl_2) en un embudo de decantación, se lavó con 100 ml de $NaHCO_3$ 0,5 M. La capa orgánica se recogió, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró para dar una película de color amarillo (0,107 g, 0,09 mmol, 52,5 %). TLC R_f = 0,40 (MeOH/ CH_2Cl_2 10/90) ^{1}H RMN ($CDCl_3$) δ: 7,2-7,12 (m, 6H), 6,8-6,72 (m, 6H), 5,84 (s ancho, 2H), 5,04-4,90 (m, 6H), 4,44-4,34(m, 2H), 3,7 (m, 9H), 2,6 (s ancho, 2H), 2,3 (m, 2H), 2,06 (m, 1H), 1,85 (m, 1H), 1,66 (m, 1H), 1,55 (m, 1H), 1,44-1,12 (m, 4H). ESIMS: 680 [M+1]$^+$. El compuesto **1** se usó inmediatamente en la siguiente etapa.

bis-(4-metoxi-bencil) éster del ácido 2-{3-[5-[7-(2,5-Dioxo-pirrolidin-1-iloxicarbonil)-heptanoilamino]-1-(4-metoxi-benciloxicarbonil)-pentil]-ureido}-pentanodioico (6).

Se secó a la llama un matraz de fondo redondo de 100 ml bajo N_2, después de lo cual se añadió **1** (0,08 g, 0,12 mmol) y luego se disolvió en 10 ml de DMF seco. Esta solución se añadió gota a gota a una solución de bis-(N-hidroxisuccinimida éster) del ácido suberico, DSS, (0,13 g, 0,35 mmol en 10 ml de DMF) a temperatura ambiente con agitación suave. Después de 2 h, el volumen de la solución se redujo al vacío y el residuo sólido incoloro se mantuvo a alto vacío durante 2 h más para eliminar las trazas de DMF. El residuo se disolvió en 1 ml de CH_2Cl_2 y se cargó en una columna de gel de sílice (1 pulgada x 12 pulgadas). Inicialmente, la columna se eluyó con CH_3CN/CH_2Cl_2 40/60 para eliminar el exceso de DSS seguido de CH_3CN/CH_2Cl_2 50/50 para proporcionar el producto como sólido incoloro. Rendimiento: 0,062 mg, 0,07 mmol, 56,6 %. TLC R_f = 0,47 (MeOH/CH_2Cl_2 5/95). ^{1}H RMN ($CDCl_3$) δ: 7,26(m, 6H), 6,86(m, 6H), 5,91(m, 1H), 5,37(m, 4H), 5,03(m, 6H), 4,43(m, 3H), 3,79(s, 9H), 3,31(m, 4H), 2,82(s, 4H), 2,58(t, *J* = 8,4 Hz, 2H), 2,37(m, 2H), 2,14(m, 4H), 1,71-1,21(m, 9H). ESIMS m/z: 933 [M+1], (HRFAB$^+$- MS): Calculado para $C_{48}H_{61}N_4O_{15}$ [M+1]$^+$, 933,4133, encontrado 933,4142 [M+1]$^+$.

Ejemplo 2: ácido 2-[3-(5-{7-[5-(Bis-piridin-2-ilmetil-amino)-1-carboxi-pentilcarbamoil]-heptanoilamino}-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico (L1). (Ejemplo de referencia)

Se añadió una solución de 7 (Levadala, M. K.; et al. Síntesis 2004, 11, 1759-1766) (0,035 g, 0,107 mmol en 0,5 ml de MeOH) a una solución agitada de **6** (0,100 g, 0,107 mmol en 6 ml de DMF seco) a temperatura ambiente, seguido de la adición de 0,2 ml de NEt_3. La mezcla de reacción se agitó durante 10 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró luego a presión reducida. El aislamiento del producto (CH_2Cl_2, agua, Na_2SO_4) seguido de cromatografía instantánea (Me-OH/ CH_2Cl_2 50/50) proporcionó el compuesto intermedio como sólido incoloro con un rendimiento del 74 % (0,090 g, 0,08 mmol). TLC R_f = 0,45 (MeOH/CH_2Cl_2 40/60). ESIMS m/z: 1146,7 [M+1]$^+$, 1168,7 [M+Na]$^+$. El compuesto intermedio anterior (20 mg, 0,017 mmol) se disolvió en una solución enfriada con hielo de TFA (7 ml) y anisol (0,3 ml) y se agitó durante 10 minutos. Se retiró el baño de hielo y la solución se dejó calentar a temperatura ambiente con agitación continua durante otros 10 min. La solución se evaporó a presión reducida y el residuo de color marrón claro se secó a alto vacío durante 2 h. El residuo se lavó con éter dietílico (3 X 5 ml) y agua (10 X 2 ml) para producir **L1** en bruto. Rendimiento: 9 mg, 0,011 mmol, 65 %. El producto incoloro se secó al vacío y se purificó adicionalmente mediante HPLC usando agua al 75/25 (TFA al 0,1 %)/acetonitrilo (TFA al 0,1 %) como fase móvil, velocidad de flujo de 2 ml/min; R_t = 14 min. ^{1}H RMN (D_2O) δ: 8,71(d, *J* = 5,6 Hz, 2H), 8,52(t, *J* = 8 Hz, 2H), 8,05(d, *J* = 8 Hz, 2H), 7,96(t, *J* = 6,8 Hz, 2H), 4,32-4,18(m, 7H), 3,80-3,70(m, 1H), 3,18(t, *J* = 6 Hz, 2H), 2,69(m, 2H), 2,51(t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 2,40-2,18(m, 25H). ^{13}C RMN (D_2O) δ:177,2, 177,13, 163,10, 162,8, 159,2, 152,4, 146,1, 142,3, 126,8, 126,1, 55,8, 54,4, 46,6, 38,8, 35,6, 35,2, 30,6, 30,0, 29,9, 27,7, 27,6, 26,3, 25,2, 25,0, 24,3, 22,4, 22,3. ESIMS m/z: 786 [M+1]; HRFAB$^+$-MS: Calculado para $C_{38}H_{56}N_7O_{11}$ [M+1], 786,4038; encontrado: 786,4033.

Los compuestos **L1**-**L3** se prepararon siguiendo el mismo procedimiento sintético general que se muestra en el Esquema 2 para **L1** como un caso representativo.

Ejemplo 3: ácido 2-[3-(5-{7-[5-(Bis-quinolin-2-ilmetil-amino)-1-carboxi-pentilcarbamoil]-heptanoilamino}-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico (L2). (Ejemplo de referencia)

El compuesto **L2** se obtuvo haciendo reaccionar el compuesto **8** (Stephenson, K. A.; et al. JAm Chem Soc 2004, 126, 8598-8599) con el compuesto **6** de manera similar a como se describió anteriormente para **L1**. La purificación por HPLC se realizó usando 70/30 de agua (0,1 % de TFA)/CH_3CN (0,1 % de TFA) como fase móvil, velocidad de flujo de 4 ml/min; R_t= 9 min. ^{1}H RMN(D_2O/CD_3CN 2/1) δ: 8,81 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 8,42 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 8,33 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 8,22 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 8,05 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,97 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 5,11 (s, 4H), 4,66-4,64 (m, 1H), 4,57-4,54 (m, 1H), 4,47-4,46 (m, 1H), 3,71 (m, 2H), 3,51-3,43(m, 3H), 2,77 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 2,51(m, 3H) 2,20-1,5(m, 26H). ESIMS m/z: 902 [M + H_2O]; HRFAB$^+$-MS: $C_{46}H_{60}N_7O_{12}$ [M+H_2O], 902,4300; encontrado 902,4290.

Ejemplo 4: ácido 2-[3-(5-{7-[5-(Bis-piridin-2-ilmetil-amino)-5-carboxi-pentilcarbamoil]-heptanoilamino}-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico (L3). (Ejemplo de referencia)

El compuesto **L3** se preparó haciendo reaccionar el compuesto **9** (Levadala, et al. Synthesis 2004, 11, 1759-1766) con el compuesto **6** de manera similar a como se describió anteriormente para **L1**. La purificación por HPLC se realizó usando 75/25 de agua (0,1 % de TFA)/CH_3CN (0,1 % de TFA) como fase móvil, velocidad de flujo de 2 ml/min, R_t = 8 min. ^{1}H RMN (D_2O) δ: 8,68(d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 8,50(t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 8,06 (d, *J* = 5,6 Hz, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,94(t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 4,32-4,37(m, 4H), 4,25(m, 1H), 4,18(m, 1H), 3,48(t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 3,16(m, 2H), 2,69(m, 2H), 2,48(t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,18-2,15(m, 5H), 1,97-1,20(m, 21H). ESIMS *m/z*: 786 $[M+1]^+$; HRFAB$^+$-MS: Calculado para $C_{38}H_{55}N_7O_{11}$, 786,4038 [M+1], encontrado: 786,4032.

Ejemplo 5: ácido 2-[3-(1-Carboxi-5-{7-[6-(carboximetil-piridin-2-ilmetil-amino)-hexilcarbamoil]-heptanoilamino}-pentil)-ureido]-pentanodioico (L4). (Ejemplo de referencia)

El compuesto **10** se preparó siguiendo un procedimiento publicado (Mueller, C.; et al. J Organometal Chem 2004, 689, 4712-4721). El compuesto **11** se preparó de la siguiente manera: a una solución del compuesto **10** (0,517 g, 1,7 mmol) en 10 ml de CH_2Cl_2 se añadió una solución de monohidrato de ácido glioxílico (1,55 g, 1,68 mmol en 1 ml de MeOH que contiene tamices moleculares activados) y se agitó durante 30 min. Se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (0,712 g, 3,3 mmol) a la solución en pequeñas porciones y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El aislamiento del producto (CH_2Cl_2, agua, NaCl, Na_2SO_4) proporcionó un compuesto en bruto que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento: 0,483 g, 1,32 mmol, 78,6 %. TLC R_f = 0,37 (MeOH/CH_2Cl_2 10/90). ^{1}H RMN ($CDCl_3$) δ: 8,62(m, 1H), 7,75(m, 1H), 7,32(m, 2H), 4,56(bs, 1H), 4,04(s, 2H), 3,46(s, 2H), 3,14(m, 2H), 2,78(m, 2H), 2,09(m,1H), 1,74-1,16(m, 16H). ESIMS m/z: 366,7 [M+1], 388,5 [M+Na]. La eliminación de t-Boc se realizó disolviendo el compuesto en bruto (0,483 g, 1,32 mmol) en una solución helada de 10 ml de TFA/CH_2Cl_2 1/1. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 4 h. La solución se evaporó a presión reducida y se secó al vacío para proporcionar un sólido incoloro de **11** y se usó sin purificación adicional. Rendimiento: 0,315 g, 1,19 mmol, 90 %. ^{1}H RMN (MeOH-d_4) δ: 8,52 (d, *J* = 5,6 Hz 1H), 7,78 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,54 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,29 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 3,78 (s, 2H), 3,22 (s, 2H), 2,85 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 2,5 (t, 2H), 1,72-1,20 (m, 8H). ESIMS m/z: 266,3 $[M+1]^+$, 288,3 $[M+Na]^+$. El compuesto **L4** se preparó mediante el acoplamiento del compuesto **6** con el compuesto **11.** El compuesto **L4** se purificó por HPLC usando 76/24 de agua (0,1 % de TFA)/CH_3CN (0,1 % de TFA) como la fase móvil, velocidad de flujo: 2 ml/min, R_t = 10,2 min. ^{1}H RMN (D_2O) δ: 8,62 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H), 8,15 (t, *J* = 6,4 Hz, 1H), 7,95 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,88 (t, *J* = 6,4 Hz, 1H), 4,25 (m, 1H), 4,23-4,1 (m, 2H), 3,35 (m, 2H), 3,25-3,31 (m, 5H), 2,84 (m, 1H), 2,52 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H,) 2,27(m, 6H), 1,64-1,21 (m, 23H). ESIMS m/z: 723 $[M+1]^+$ y 745,7 para $[M+Na]^+$, HRFAB$^+$-MS: Calculado para $C_{35}H_{55}N_6O_{11}$ 723,3929 [M+1], encontrado 723,3912.

Ejemplo 6: ácido 2-(3-{5-[8-(Bis-piridin-2-ilmetil-amino)-octanoilamino]-1-carboxi-pentil}-ureido)-pentanodioico (L5). (Ejemplo de referencia)

A una solución de ácido 8- (bis-piridin-2-ilmetil-amino) -octanoico (Levadala, et al. Synthesis 2004, 11, 1759-1766)) (0,9 g, 2,6 mmol, 15 ml de DMF) se le añadió hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-*N,N,N',N'*-tetrametiuronio (1,49 g, 3,9 mmol) y N-hidroxisuccinimida (0,36 g, 3,1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Después de eliminar el solvente a presión reducida, el producto en bruto se purificó por cromatografía instantánea (MeOH/CH_2Cl_2 10/90) para dar **12** como un líquido espeso e incoloro. Rendimiento: 0,75 g, 0,17 mmol, 65 %. ^{1}H RMN ($CDCl_3$) δ: 8,58 (d, *J* = 4,8 Hz, 2H), 7,78 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,50 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 7,32 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 4,62 (s, 4H), 3,27 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 2,82 (s, 4H), 2,58 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 1,82-1,66 (m, 4H), 1,33-1,28(m, 6H). ESIMS: 439 $[M+1]^+$. A una solución de **12** (0,052 g, 0,11 mmol en 7 ml de CH_2Cl_2) se le añadieron **5** (0,1 g, 0,11 mmol) seguido de NEt_3 (0,2 ml, 1,4 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 h, luego se concentró a presión reducida. El aislamiento del producto (EtOAc, agua, NaCl, Na_2SO_4) seguido de cromatografía instantánea (MeOH/CH_2Cl_2 50/50) proporcionó el compuesto puro del éster 4-metoxibencílico de **L5** con un rendimiento del 51 % (0,060g, 0,056 mmol). La escisión de los grupos PMB agitando durante 2 h en TFA/CH_2Cl_2 1/1 seguido de la eliminación del solvente dio un residuo sólido. El residuo se disolvió en 7 ml de agua, se lavó con 3 X 10 ml de CH_2Cl_2 y la capa acuosa se concentró al vacío para proporcionar **L5** en bruto. El compuesto se purificó adicionalmente mediante HPLC con una solución de agua 80/20 (TFA al 0,1 %)/CH_3CN (TFA al 0,1 %) como fase móvil. La velocidad de flujo fue de 3 ml/min, R_t = 8 min. ^{1}H RMN (D_2O) δ: 8,74 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H); 8,52 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 8,04 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,95 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 4,32 (s, 4H), 4,23 (s, 1H), 4,14 (s, 1H), 3,24 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 2,67 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 2,49 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,16 (m, 3H), 1,95 (m, 1H), 1,79 (m, 1H), 1,68 (m, 1H), 1,6-1,0 (m, 14H). ESIMS m/z: 643 $[M+1]^+$; HRFAB$^+$-MS: Calculado para $C_{32}H_{47}N_6O_8$, 643,3455 [M+1], encontrado 643,3463.

Ejemplo 7: ácido 2-{3-[5-(Bis-piridin-2-ilmetil-amino)-1-carboxi-pentil]-ureido}-pentanodioico (L6). (Ejemplo de referencia)

A una solución de piridina-2-aldehído (50 mg, 0,44 mmol en 4 ml de CH_2Cl_2) se le añadió una solución de **1** (100 mg, 0,147 mmol en 4 ml de CH_2Cl_2). Esto se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y luego se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (93 mg, 0,44 mmol), con agitación durante 3 h adicionales mientras se calentaba a temperatura ambiente. El aislamiento del producto (CH_2Cl_2, agua, NaCl, Na_2SO_4) seguido de cromatografía instantánea (MeOH/CH_2Cl_2 10/90) proporcionó un sólido incoloro como el éster tri-PMB de **L6**. La eliminación de los grupos PMB se realizó disolviendo en 5 ml de TFA/CH_2Cl_2 50/50 y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La solución resultante se concentró para proporcionar un sólido incoloro. El sólido se disolvió

en 3 ml de agua y se lavó con 5 X 5 ml de CH_2Cl_2. La capa de agua se concentró para proporcionar un sólido. Rendimiento: 132 mg, 0,26 mmol, 61 %. El producto se purificó por HPLC usando una solución de 85/15 de agua (0,1 % de TFA)/CH_3CN (0,1 % de TFA) como fase móvil. La velocidad de flujo fue de 3 ml/min, R_t = 13 min. ^{1}H RMN (D_2O): 8,78 (d, *J* = 5,2 Hz, 2H), 7,89 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,49 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 7,34 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 4,75-4,62 (m, 4H), 4,45-4,22 (m, 2H), 2,75(m, 2H), 2,55 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 2,2-1,01 (m, 7H). ESIMS: 502 [M+1]+, HRFAB$^+$: para $C_{24}H_{31}N_5O_7$ calculado: 501,2224 encontrado: 502,2296.

Ejemplo 8: ácido 2-[3-(5-{7-[6-(Bis-piridin-2-ilmetil-amino)-hexilcarbamoil]-heptanoilamino}-1-carboxipentil)-ureido]-pentanodioico (L7). (Ejemplo de referencia)

El compuesto **L7** se preparó haciendo reaccionar **13** (Levadala, et al. Synthesis 2004, 11, 1759-1766) con **6** de manera similar a como se describió anteriormente para **L1**. La purificación por HPLC se realizó usando 75/25 de agua (0,1 % de TFA)/CH_3CN (0,1 % de TFA) como fase móvil, velocidad de flujo de 3 ml/min, R_t = 5,5 min. ^{1}H RMN (D_2O) δ: 8,65 (d, *J* = 5,2 Hz, 2H), 7,99 (t, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,59-7,54 (m, 4H), 4,59 (s, 4H), 4,21-4,14 (m, 2H), 3,29-3,17 (m, 7H), 2,48 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 2,27-2,22 (m, 6H), 1,82-1,32 (m,19H). ESIMS *m*/*z*: 756 [M+1]$^+$; HRFAB$^+$-MS: Calculado para $C_{38}H_{55}N_7O_{11}$, 756,4296 [M+1] encontrado: 756,4032. Todos los compuestos de renio se sintetizaron como para Re**L1**, para lo cual se proporciona un ejemplo detallado a continuación.

Ejemplo 9: bromuro de tricarbonil (ácido 2-[3-(5-{7-[5-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-1-carboxi-pentilcarbamoil]-heptanoilamino}-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico) renio (ReL1). (Ejemplo de referencia)

El compuesto **L1** (0,058 g, 0,074 mmol) se disolvió en 10 ml de agua. Se añadió una solución de $[Re(CO)_3(H_2O)_3]Br^{37}$ (0,029 mg en 0,5 ml de metanol) y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 4 h. La solución se concentró para proporcionar un sólido incoloro que se lavó con 3 X 10 ml de éter dietílico, 3 X 10 ml de CH_2Cl_2 y finalmente con agua. Los productos se secaron al vacío y se purificaron por el procedimiento de HPLC 1. R_t = 12 min. ^{1}H RMN (D_2O/CH_3CN 5/1) δ: 9,31(d, *J* = 5,4 Hz, 2H,), 8,64 (t, *J* = 8 Hz, 2H), 7,88 (d, *J* = 8Hz, 2H), 7,85 (t, *J* = 8 Hz, 2H,), 5,25-5,18 (m, 4H), 4,26 (m, 2H), 3,61 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 2,75 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 2,66 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,55-2,45 (m, 27H). ESIMS m/z:1056 [M+]; HRFAB$^+$-MS: Calculado para $C_{41}H_{55}N_7O_{14}Re$ [M+], 1056,3364 encontrado: 1056,3350 [M+]. IR v (cm^{-1}) $[Re(CO)_3]^+$: 2030, 1912.

Ejemplo 10: Bromuro de tricarbonil(ácido 2-[3-(5-{7-[5-(bis-quinolin-2-ilmetil-amino)-1-carboxi-pentilcarbamoil]-heptanoilamino}-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico) renio (ReL2). (Ejemplo de referencia)

Para la purificación por HPLC, se usó el procedimiento 2. R_t = 16 min. ^{1}H RMN (D_2O/CD_3CN 1/1): 8,81-8,74 (m, 4H), 8,30 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 8,16 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,99 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,90 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 5,42-5,37 (m, 2H), 5,38-5,22 (m, 2H), 4,68-4,64 (m, 1H), 4,53-4,51 (m, 1H), 4,45-4,42 (m, 1H), 4,06-4,04 (m, 2H), 3,37 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H), 2,72 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,51 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,40-1,30 (bm, 24H). ESIMS m/z:, 1156 [M]+; HRFAB+-MS: Calculado para $C_{49}H_{59}N_7O_{14}Re$[M]$^+$, 1156,3677 encontrado, 1156,3662 [M+]. IR v (cm^{-1}) $[Re(CO)_3]^+$: 2028, 1900.

Ejemplo 11: bromuro de tricarbonil(ácido 2-[3-(5-{7-[5-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-5-carboxi-pentilcarbamoil]-heptanoilamino}-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico) renio (ReL3). (Ejemplo de referencia)

Para la purificación por HPLC, se usó el procedimiento 3. La velocidad de flujo fue de 2 ml/min, Rt = 11,5 min. ^{1}H RMN (D_2O/CH_3CN 5/1) δ: 9,26 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H), 9,20 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H), 8,36 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,90 (m, 2H), 7,83 (m, 2H), 5,31-5,03 (m, 4H), 3,67 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H), 3,53 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 3,15 (t, 2H), 2,40-1,30 (bm, 29H). ESIMS m/z: 1056 [M]+; HRFAB$^+$-MS: Calculado para $C_{41}H_{55}N_7O_{14}Re$ [M]$^+$, 1056,3364 encontrado:1056,3350[M+].

Ejemplo 12: Tricarbonil(ácido 2-[3-(1-carboxi-5-{7-[6-(carboximetil-piridin-2-ilmetil-amino)-hexilcarbamoil]-heptanoilamino}-pentil)-ureido]-pentanodioico) renio (ReL4). (Ejemplo de referencia)

Para la purificación por HPLC, se usó el procedimiento 1. R_t = 18 min. (D_2O:CH_3CN (5:1)) δ: 9,29 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H), 9,22 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 8,88 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,84 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H), 5,31-5,03 (m, 2H), 4,67 (m, 2H), 4,25 (m, 2H), 3,53 (m, 2H), 3,35 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H), 2,72 (m, 2H), 2,46-1,30 (bm, 30H). ESIMS m/z: 993 [M+1]+, HRFAB+-MS: Calculado para $C_{37}H_{54}N_6O_{14}Re$ 993,3255 [M+1]+, encontrado 993,3237.

Ejemplo 13: bromuro de tricarbonil(ácido 2-(3-{5-[8-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-octanoilamino]-1-carboxi-pentil}-ureido)-pentanodioico)renio (ReL5). (Ejemplo de referencia)

Para la purificación por HPLC, se usó el procedimiento 1. R_t = 17 min. ^{1}H RMN (D_2O/CH_3CN 5/1) δ: 9,23 (d, *J* = 5,6 Hz, 2H), 8,34 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,72 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 7,77 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 5,13 (m, 4H), 4,66 (m, 1H), 4,58 (m, 1H), 4,16 (m, 2H), 3,56 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H), 2,86 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 2,59-1,6 (m, 20H). ESIMS m/z: 913[M]$^+$, HRFAB$^+$-MS: Calculado para $C_{35}H_{46}N_6O_{11}Re$, [M]$^+$ 914,2860, encontrado 914,2833.

Ejemplo 14: bromuro de tricarbonil(ácido 2-{3-[5-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-1-carboxipentil]-ureido}-pentanodioico)renio (ReL6). (Ejemplo de referencia)

Para la purificación por HPLC, se usó el procedimiento 1. R_t = 10,1 min. ^{1}H RMN (CD_3CN) δ: 9,12 (d, *J* = 5,6 Hz, 2H), 8,22 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,80 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,65 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 5,03 (m, 4H), 4,59-4,58 (m, 2H), 4,08 (m, 2H), 2,79 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 2,34-2,24 (m, 6H), 1,82-1,80 (m, 2H). ESIMS: 502 $[M]^+$, HRFAB+: Calculado para $C_{72}H_{31}N_5O_{10}Re$, 772,1628, encontrado 772,1632.

Ejemplo 15: bromuro de tricarbonil(ácido 2-[3-(5-{7-[6-(Bis-piridin-2-ilmetil-amino)-hexilcarbamoil]-heptanoilamino}-1-carboxi-pentil)-ureido]-pentanodioico)renio (ReL7). (Ejemplo de referencia)

Para la purificación por HPLC, se usó el procedimiento 1. R_t = 18,0 min. ^{1}H RMN (D_2O/CD_3CN 5/1) δ: 9,43 (d, *J* = 5,2 Hz, 2H), 8,56 (t, *J* = 8,6 Hz, 2H), 8,10 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 7,97 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 5,38-5,29 (m, 4H), 4,80-4,35 (m, 2H), 3,80-3,72 (m, 5H), 3,05 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 2,8-1,82 (m, 27H).

Ejemplo 16: ácido 2-{3-[1-carboxi-5-(7-{1-carboxi-5-[2-(4,7,10-tris-carboximetil-1,4,7,10tetraaza-ciclododec-1-il)-acetilamino]-pentilcarbamoil}-heptanoilamino)-pentil]-ureido}-pentanodioico (DOTA-L1). (Ejemplo de referencia)

Se añadió una solución de H-Lys(Boc)-OtBu (0,30 g, 0,107 mmol en 0,5 ml de DMF) a una solución agitada de **6** (0,100 g, 0,107 mmol en 5 ml de DMF seco) a temperatura ambiente seguido de la adición de 0,2 ml de NEt_3. La mezcla de reacción se agitó durante 10 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró luego a presión reducida. El aislamiento del producto (CH_2Cl_2, agua, Na_2SO_4) seguido de cromatografía instantánea ($MeOH/CH_2Cl_2$ 10/90) proporcionó el compuesto **14** como un sólido incoloro con un rendimiento del 74 % (0,090 g, 0,08 mmol). TLC R_f = 0,45 ($MeOH/CH_2Cl_2$ 10/90). ESIMS m/z: 1186,5 $[M+1]^+$. El compuesto **14** (20 mg, 0,017 mmol) se disolvió en una solución helada de TFA (2 ml) y CH_2Cl_2 (2 ml) y se agitó durante 10 minutos. Se retiró el baño de hielo y la solución se dejó calentar a temperatura ambiente con agitación continua durante 1 h. La solución se evaporó a presión reducida y el residuo de color marrón claro se secó a alto vacío durante 2 h. El residuo se lavó con éter dietílico (3 X 5 ml) y agua (10 X 2 ml) para producir el compuesto de urea en bruto **16**. Rendimiento: 9 mg, 0,015 mmol, 88 %. El producto incoloro se secó al vacío y se purificó adicionalmente mediante HPLC usando 86/14 de agua (0,1 % de TFA)/acetonitrilo (0,1 % de TFA) como fase móvil, velocidad de flujo de 4 ml/min; R_t = 6 min. ^{1}H RMN (D_2O) δ: 4,32-4,18(m, 3H), 3,30(t, 1H), 3,05(m, 1H), 2,54(t, *J* = 6 Hz, 2H), 2,35(m, 2H), 2,21 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 2,10-1,18(m, 15H). ESIMS m/z: 604,5 $[M+1]^+$. Al compuesto **16** (9 mg, 0,015 mmol en 300 µl de solución reguladora PBS, pH 7,2) se le añadió DOTA-NHS (comprado de Macrocyclics, TX, USA) (0,039 mmol) y la solución se agitó durante 3 horas a rt. El producto en bruto se purificó por HPLC usando 86/14 de agua (0,1 % de TFA)/acetonitrilo (0,1 % de TFA) como fase móvil, velocidad de flujo de 4 ml/min; R_t = 9 min. ^{1}H RMN (D_2O) δ: 4,32-4,18(m, 3H), 3,90-3,05(m, 16H), 2,54(t, *J* = 6 Hz, 2H), 2,21(m, *J* = 7,6 Hz, 4H), 2,10-1,1 1(m, 34H). ESIMS m/z: 990 $[M+1]^+$. HRFAB$^+$-MS: Calculado para $C_{42}H_{72}N_9O_{18}$, 990,4995 [M+1], encontrado: 990,5100. IC50: 0,8 nM.

Marcación con In-111: se incubaron 800 µCi de $^{111}InCl_3$ en HCl 0,2 N con 100 µl de solución reguladora de acetato de sodio 0,2 M, de modo que el pH final de la solución fue de -5,5 a 90 °C, durante 45 min. El producto radiomarcado se purificó mediante HPLC usando agua 90/10 (0,1 % de TFA)/acetonitrilo (0,1 % de TFA) como fase móvil, velocidad de flujo de 4 ml/min; R_t = 18 min. El rendimiento de radiomarcación fue del 50 % y la pureza radioquímica fue> 95 %.

Ejemplo 17: radioquímica. (Ejemplo de referencia)

Los compuestos **L1**-**L7** se sintetizaron en forma radioactiva (marcada con ^{99m}Tc) usando el mismo procedimiento general que se describe a continuación para [^{99m}Tc]**L1**. Todos los compuestos marcados con Tc-99m se sintetizaron con rendimientos radioquímicos de > 70 % y purezas radioquímicas de > 98 %.

Preparación de $[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$, ejemplo típico: se añadieron 11,2 mCi (en 1 ml de solución salina) $^{99m}TcO_4$ - al kit Isolink y la mezcla de reacción se calentó en un baño de agua a 95 °C, durante 30 minutos se dejó enfriar a temperatura ambiente. Preparación de ^{99m}TcL, ejemplo típico: 500 µl de la solución $[^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3]^+$ (2,3 mCi) se neutralizaron con 50 µl de HCl 1(N). A esto se añadieron 200 µl de solución salina regulada con fosfato (PBS) y 300 µl de una solución de **L1** (4 mg, 5,09 µmol en 2,5 ml de agua). Esto se mantuvo a 95 °C, durante 30 min. El vial se enfrió durante 5 min a temperatura ambiente. Esto se diluyó con 750 µl de la fase móvil de HPLC y se purificó por radio-HPLC (Procedimiento 1). El pico radiactivo principal que constituye el producto deseado (1,6 mCi) se eluyó a los 14 min. El eluato ácido se neutralizó con 100 µl de solución de $NaHCO_3$ 0,1 M y el volumen se redujo a 400 µl, pH 8 a presión reducida. Esto se diluyó con PBS a la concentración de radioactividad deseada para estudios de biodistribución y de obtención de imágenes ex vivo. Rendimiento radioquímico [^{99m}Tc]**L1**: 82,05 %. Pureza radioquímica = 98,99 %.

Ejemplo 18: Espectros de fluorescencia. (Ejemplo de referencia)

Los espectros de fluorescencia se registraron usando un espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse usando una excitación de 321 nm de una lámpara de arco de xenón. El compuesto Re**L2** se disolvió en etilenglicol. Las mediciones se realizaron al aire o después de la purga con argón de la solución. Las mediciones de por vida se realizaron usando un espectrofluorímetro de dominio de frecuencia Modelo D2, ISS, Inc. La longitud de onda de excitación fue de 370 nm desde el LED UV. Los datos de intensidad de fluorescencia se recogieron a través de un

filtro de paso de banda en la región espectral 540 - 600 nm. Los rendimientos cuánticos de luminiscencia se midieron mediante el procedimiento de dilución óptica (Nakamura, K. Bull Chem Soc Japn 1982, 55, 2697-2705) usando una solución acuosa aireada de $[Ru(bpy)_3]Cl_2$ (ϕ = 0,028, longitud de onda de excitación a 455 nm) como la solución estándar (Crosby, G. A.; Demas, J. N. J Phys Chem 1971, 75, 991-1024).

Ejemplo 19: Ensayo de NAALADasa. (Ejemplo de referencia)

La hidrólisis de NAAG se realizó esencialmente como se describió anteriormente (Robinson, M. B.; et al. J Biol Chem 1987, 262, 14498-14506; Lupold, S. E.; et al. Cancer Res 2002, 62, 4029-4033.). En resumen, los extractos de células LNCaP se prepararon por sonicación en solución reguladora NAALADasa [Tris 50 mM (pH 7,4) y Triton X-100 al 0,5 %]. Los lisados celulares se incubaron con o sin inhibidor a 37 °C, durante 10 minutos. Después de la incubación, el sustrato radiomarcado de N-acetil-L-aspartil-L-(3,4-^{3}H) glutamato (NEN Life Science Products, Boston, MA) se añadió a una concentración final de 30 nM a 37 °C, durante 10-15 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de un volumen igual de fosfato de sodio 100 mM helado y EDTA 2 mM. Los productos se sometieron a partición mediante cromatografía de intercambio aniónico de resina de formiato AG 1-X8 (Bio-Rad Laboratories), se eluyeron con formiato de sodio 1 M y se cuantificaron por recuento de centelleo líquido. Las curvas de inhibición se determinaron usando gráficos semilog y los valores de IC_{50} se determinaron a la concentración a la que se inhibió la actividad de la enzima en un 50 %. Los ensayos se realizaron por triplicado, repitiéndose todo el estudio de inhibición al menos una vez para confirmar la afinidad y el modo de inhibición. Los datos se recolectaron durante la fase lineal de hidrólisis (esto es, <20 % de escisión del sustrato total). Se generaron constantes inhibidoras de la enzima (valores de K_i) usando la conversión de Cheng-Prusoff (Cheng, Y.; Prusoff, W. H. Biochem Pharmcol 1973, 22, 3099-3108).

Tabla 1. Actividad inhibidora de PSMA y ClogD calculado. (como referencia)

	Ki[nM]	**95 % CI***	**ClogD**
L1	15,25	7,93	-7,69
ReL1	10,75	3,81	
L2	0,17	0,05	-3,91
ReL2	0,50	0,07	
L3	1,08	0,14	-7,19
ReL3	10,34	3,76	
L4	2,54	0,60	-6,13
ReL4	0,17	0,08	
L5	1,86	0,21	-5,05
ReL5	0,91	0,44	
L6	7,53	5,65	-6,25
ReL6	199,56	135,26	
L7	0,45	0,25	-5,61
ReL7	2,06	0,25	
PMPA	0,20	0,06	-8,65
*intervalo de confianza			

Ejemplo 20: Cultivo Celular y Biodistribución Ex Vivo. (como referencia)

Las células PSMA+ PC3 PIP (carcinoma metastásico [óseo] de próstata humano) diseñadas para expresar PSMA de manera estable y las células de la gripe PSMA-PC3 fueron proporcionadas generosamente por Warren Heston (Cleveland Clinic). Las células se cultivaron en matraces T175 usando medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con FBS al 10 % y penicilina/estreptomicina (100 U/ml/100 μg/ml) a 37 °C en CO_2 al 5 % en aire. Cuando un número suficiente de células estaban presentes en el cultivo, las células se tripsinizaron y formularon en solución salina regulada de Hanks estéril (Sigma, HBSS) y se contaron con un hemocitómetro y un colorante de azul de tripano para confirmar la viabilidad celular. Por lo general, se inyectaron por vía subcutánea 2-5 x 10^6 células, de manera que las células PC3 PIP se inyectaron detrás del hombro izquierdo y las células PC3 de la gripe se inyectaron detrás del hombro derecho de ratones inmunodeficientes combinados severos (SCID). Todos los procedimientos experimentales in vivo se realizaron de conformidad con las leyes de los Estados Unidos que rigen la experimentación con animales y fueron aprobados por the Johns Hopkins University Institutional Animal Care and Use Committee. Los ratones se usaron cuando los tumores alcanzaron un diámetro de 3-7 mm ya sea para los estudios de biodistribución ex vivo o la SPECT-CT in vivo.

Los ratones portadores de xenoinjertos (17-20 g) se inyectaron a través de la vena de la cola con 3,70 MBq (100 μCi) de [^{99m}Tc] **L1**-**4** en 200 μl de solución salina. La sangre se extrajo inmediatamente después del sacrificio (dislocación cervical) mediante punción cardíaca y corazón, pulmón, hígado, estómago, páncreas, bazo, grasa blanca, riñón, músculo, intestino delgado, intestino grueso, vejiga urinaria, se extrajeron xenoinjertos tumorales, se pesaron y se contaron en un contador gamma automatizado (LKB Wallace 1282 Compugamma CS Universal Gamma Counter). Los animales se sacrificaron a los 30, 60, 120 y 300 minutos postinyección (n = 4 por punto de tiempo). Los valores de captación de radiofármacos tisular se calcularon como porcentaje de dosis inyectada por gramo (% ID/g) en comparación con una dosis estándar diluida de 1:10. La vejiga urinaria se vació y se lavó con agua y luego se secó antes de pesar y contar.

Tabla 2. Biodistribución de [^{99m}Tc] **L1** en ratones portadores de tumores (como referencia)

30 min.	**60 min.**	**120 min.**	**300 min.**	
Sangre	0,54 ± 0,39	0,11 ± 0,04	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00
corazón	0,19 ± 0,13	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00
pulmón	0,64 ± 0,23	0,18 ± 0,06	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,06
hígado	1,49 ± 1,12	0,25 ± 0,15	0,08 ± 0,04	0,04 ± 0,01
estómago	0,35 ± 0,15	0,17 ± 0,00	0,41 ± 0,61	0,03 ± 0,01
páncreas	0,18 ± 0,10	0,05 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00
bazo	10,59 ± 6,05	1,81 ± 1,10	0,59 ± 0,29	0,07 ± 0,04
grasa	0,36 ± 0,14	0,11 ± 0,03	0,05 ± 0,07	0,01 ± 0,00
riñón	95,66 ± 22,06	68,54 ± 8,32	10,08 ± 5,71	1,26 ± 0,67
músculo	0,39 ± 0,12	0,25 ± 0,15	0,056 ± 0,04	0,04 ± 0,05
intestino delgado	5,87 ± 2,35	1,29 ± 0,76	0,38 ± 0,13	0,03 ± 0,01
intestino grueso	2,28 ± 2,03	16,02 ± 12,39	1,30 ± 2,00	0,10 ± 0,09
vejiga	2,31 ± 0,88	2,19 ± 1,78	5,01 ± 8,18	0,80 ± 1,33
PC-3 PIP	7,87 ± 3,95	3,86 ± 0,57	2,31 ± 0,84	0,84 ± 0,51
PC-3 gripe	0,34 ± 0,15	0,16 ± 0,08	0,05 ± 0,02	0,01 ± 0,01
PIP: músculo	20	15	41	23
gripe: músculo	0,9	0,6	0,9	0,3
PIP: gripe	23	25	44	68

Valores expresados están en % ID/g ± desviación estándar. N = 4 para todos los tejidos.

Tabla 3. Biodistribución de [^{99m}Tc]**L2** en ratones portadores de tumores (como referencia)

	30 min.	**60 min.**
Sangre	0,28 ± 0,05	0,36 ± 0,11
corazón	0,23 ± 0,01	0,22 ± 0,06
pulmón	0,82 ± 0,17	0,69 ± 0,14
hígado	1,75 ± 0,40	1,15 ± 0,33
estómago	0,45 ± 0,12	0,36 ± 0,30
páncreas	0,35 ± 0,20	0,34 ± 0,16
bazo	10,36 ± 9,64	15,32 ± 6,64
riñón	47,86 ± 8,88	86,02 ± 13,93
músculo	0,54 ± 0,27	0,26 ± 0,11
intestino delgado	5,22 ± 1,92	2,35 ± 1,90
intestino grueso	1,25 ± 1,21	0,53 ± 0,42
vejiga	0,46 ± 0,31	0,39 ± 0,18
PC-3 PIP	1,09 ± 0,61	2,04 ± 0,25
PC-3 gripe	0,34 ± 0,18	0,46 ± 0,17
PIP: músculo	2	8
gripe: músculo	0,6	2
PIP: gripe	3	4

Valores en porcentaje de dosis inyectada por gramo ± Desviación estándar. N = 4 para todos los tejidos.

Tabla 4. Biodistribución de [^{99m}Tc] **L3** en ratones portadores de tumores (como referencia)

30 min.	**60 min.**	**120 min.**	**300 min.**	
Sangre	0,68 ± 0,19	1,81 ± 1,61	0,08 ± 0,05	0,02 ± 0,00
corazón	0,51 ± 0,13	1,56 ± 1,05	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01
pulmón	2,48 ± 0,95	3,14 ± 1,82	0,13 ± 0,01	0,07 ± 0,00
hígado	1,47 ± 0,14	2,85 ± 1,815	0,22 ± 0,05	0,17 ± 0,01
estómago	0,74 ± 0,15	3,87 ± 3,02	0,36 ± 0,19	0,12 ± 0,06
páncreas	0,61 ± 0,14	5,71 ± 4,68	0,12 ± 0,08	0,05 ± 0,00
bazo	32,07 ± 16,36	25,90 ± 10,08	0,98 ± 0,25	0,42 ± 0,07
grasa	0,59 ± 0,17	4,67 ± 5,89	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,00
riñón	163,57 ± 29,62	178,56 ± 35,45	29,87 ± 27,09	1,91 ± 0,45
músculo	0,92 ± 0,25	1,42 ± 1,32	0,73 ± 0,25	0,04 ± 0,01
intestino delgado	10,62 ± 5,30	21,03 ± 4,46	0,58 ± 0,23	0,28 ± 0,20

(continuación)

30 min.	60 min.	120 min.	300 min.	
intestino grueso	1,64 ± 0,71	6,49 ± 4,91	0,80 ± 0,40	0,53 ± 0,24
vejiga	3,30 ± 1,06	10,38 ± 6,28	21,63 ± 35,22	0,43 ± 0,19
PC-3 PIP	11,56 ± 2,86	6,59 ± 5,22	1,89 ± 0,21	0,75 ± 0,55
PC-3 gripe	0,53 ± 0,15	0,53 ± 1,69	0,32 ± 0,27	0,18 ± 0,17
PIP: músculo	13	5	3	18
gripe: músculo	0,6	1	0,4	4
PIP: gripe	23	4	6	4

Valores en porcentaje de dosis inyectada por gramo ± desviación estándar. N = 4 para todos los tejidos.

Ejemplo 21: imágenes SPECT-CT de xenoinjertos de PC3 PIP y PC3 gripe. (como referencia)

Los compuestos **L1-L4** se estudiaron con obtención de imágenes. Los modelos de xenoinjerto se generaron como se describe anteriormente. Los ratones se anestesiaron usando gas isoflurano al 1 % en oxígeno que fluye a 0,6 L/min antes y durante la inyección de radiofármacos. Los ratones fueron inyectados a través de la vena de la cola con aproximadamente 480 μCi (17,76 MBq) de cualquiera **L1**, **L2**, **L3** o **L4** formulados en 200 μl de PBS, pH 7. Permitiendo 15 minutos de captación de radiofármacos, se colocaron ratones anestesiados en la estructura de soporte del escáner. y asegurado con cinta médica mientras el flujo de anestesia se incrementó a 0,8 L/min. La temperatura corporal de los ratones se mantuvo cubriéndolos con varias capas de almohadillas desechables Chux, además de mantenerlas iluminadas con una lámpara de disección durante el escaneo. Se usó un escáner Gamma Medica (Northridge, CA) X-SPECT equipado con dos agujeros estenopeicos opuestos de abertura de 0,5 mm de bajo consumo de energía y CT sintonizable para todos los barridos. Los ratones fueron escaneados en 180° en 5,5°, en incrementos de 30 segundos. Se realizó una CT antes de la gammagrafía tanto para el registro anatómico como para la corrección de atenuación. Los datos se reconstruyeron y fusionaron usando un software comercial del proveedor (Gamma Medica), que incluye un algoritmo 2D-OSEM.

Ejemplo 22: Estudio de especificidad de unión in vivo (bloqueo). (como referencia)

[^{99m}Tc] **L1** [1,1 mCi (40,7 MBq)] en 200 μl de solución salina se administró a través de la vena de la cola a un animal anestesiado portador de tumor LNCaP (PSMA+). Al mismo tiempo, a un segundo animal, también portador de un tumor LNCaP, se le administró un cóctel que contenía 1,2 mCi (44,4 MBq) de [^{99m}Tc]**L1** y 1 mg de PMPA (Axxora Platform, San Diego, CA) en un volumen total de 200 μl de solución salina. La obtención de imágenes SPECT-CT se realizó como se describió anteriormente, con ambos animales en la estructura de soporte del escáner.

Ejemplo 23: Estudios de metabolitos. (como referencia)

Se inyectaron ratones CD-1 machos (Charles River Laboratories) con 15 μCi (555 kBq) de [^{99m}Tc]**L1** en solución salina a través de la vena de la cola. Los ratones se sacrificaron a los 30 min o 1 h postinyección por dislocación cervical y se extrajeron su sangre y los órganos seleccionados. Las muestras de sangre se extrajeron con jeringas heparinizadas y los tejidos se colocaron en hielo antes de la homogeneización manual en PBS, pH 7,4. Los homogeneizados de plasma y tejido en PBS se centrifugaron durante 2 minutos a 13.000 x g a temperatura ambiente. Una porción del sobrenadante se diluyó a 4 ml en urea 8 M que contenía 50 mg de ácido cítrico. Las muestras de orina se añadieron directamente a 4 ml de la solución de urea acidificada. Las muestras se sometieron luego a separación por HPLC como se describió anteriormente (Hilton, J.; et al. Nucl Med Biol 2000, 27, 627-630). En resumen, la muestra de 4 ml en urea acidificada 8 M se pasó a través de una columna de captura (Strata-X, 19 x 4,4 mm, Phenomenex, Torrance, CA.) a 2 ml/min seguido de acetonitrilo al 1 % en agua para lavar las proteínas plasmáticas de la columna. El efluente de la columna de captura, que contiene solo componentes altamente polares, fluyó a través de un detector dual BGO (Bioscan, Washington, DC) que opera en el modo de diodo. El solvente se cambió luego a acetonitrilo al 30 %: solución reguladora fosfato 50 mM a pH 2,4 (2 ml/min) para la elución de los componentes radiomarcados previamente unidos a la columna de captura en la columna analítica (Synergi Polar-RP 250 x 4,6 mm 10 micras tamaño de partícula Phenomenex).

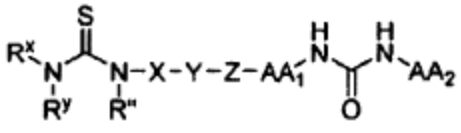
Ejemplo 24: Microscopía de fluorescencia in vitro de ReL2 en células PC3 PIP y PC3 de gripe. (como referencia)

Se formuló la hipótesis de que el compuesto **L2**, cuando estaba unido al núcleo $[Re(I)(CO)3]^+$, era fluorescente, ya que se sabe que el correspondiente quelante de bisquinolina tiene propiedades fluorescentes (Banerjee, S. R.; et al.

Chem Commun (Camb) 2005, 1784-1786; Stephenson, K. A.; et al. J Am Chem Soc 2004, 126, 8598-8599; James, S.; et al. Bioconjug Chem 2006, 17, 590-596; Banerjee, S. R.; et al. Inorg Chim Acta 2006, 359, 1603-1612). Después de la preparación reciente de Re**L2**, se sembraron 10.000 células PC3 PIP y PC3 gripe por separado en cada uno de los cuatro pocillos de un portaobjetos de cámara de 8 pocillos Lab-Tek II (Fisher Scientific). Las células se cultivaron como se describe anteriormente y se dejaron unir al fondo de los pocillos durante la noche a 37 °C en CO_2 al 5 % en aire. Se añadieron partes alícuotas de Re**L2** diluidas en serie a los medios en seis de los pocillos, de modo que los pocillos contenían Re**L2** 500 nM, 250 nM o 125 nM, quedando dos libres de fluoróforo. Las células se devolvieron a la incubadora durante una hora para permitir la unión. Luego, cada pocillo se lavó cuidadosamente eliminando el sobrenadante seguido de la adición de medio de cultivo caliente durante 30 segundos. Luego se retiró el medio de lavado y se añadió al contenido de las cámaras de los pocillos. Luego se aplicó el medio de montaje Dako Cytomation y se añadió un cubreobjetos de vidrio. El medio de montaje se dejó secar a temperatura ambiente durante 20 minutos antes del almacenamiento del portaobjetos a 4 °C, durante la noche. Las células se observaron luego usando un microscopio de fluorescencia Olympus BX61 equipado con un cubo de triple filtro Semrock DAPI/FITC/Texas Red. La excitación se realizó a 494 nm con una colección de fluorescencia emitida a 628 nm.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula VII:

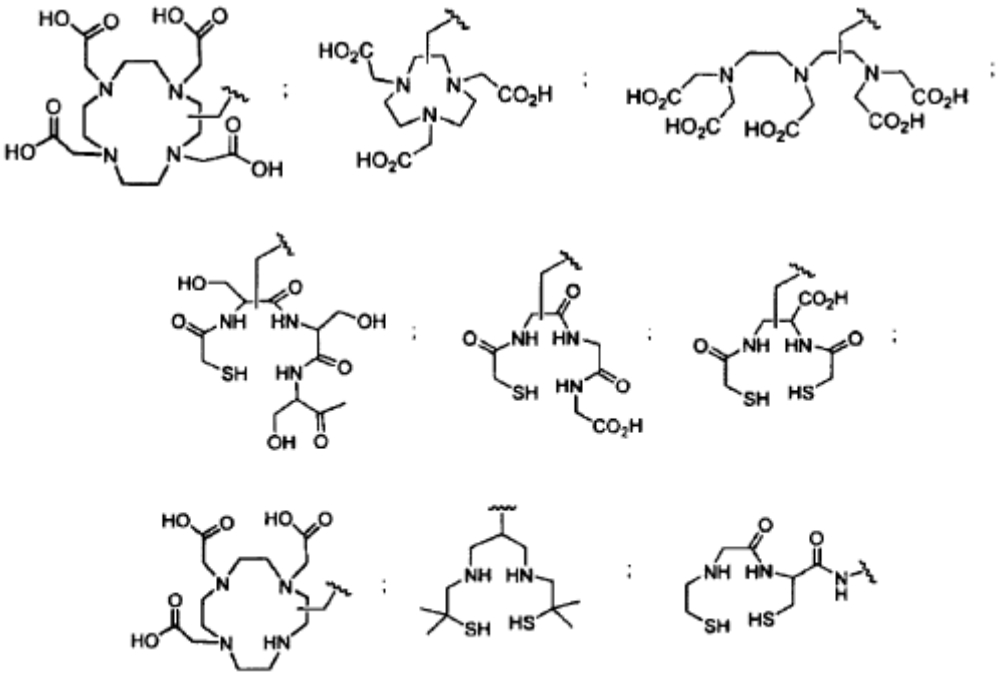


(VII);

en la que:

R" es H o alquilo C_1-C_6;

R^x es arilo sustituido con:



R^y es H o alquilo C_1-C_6;

AA_1 y AA_2 son cada uno independientemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina, ácido glutámico, tirosina y cisteína;

X y Z son cada uno independientemente alquileno C_1-C_8, alquenilo C_2-C_8, alquinilo C_2-C_8, heteroalquilo C_1-C_8, heteroalquenilo C_2-C_8, heteroalquinilo C_2-C_8, alcoxi C_1-C_8, o un enlace, cada uno de los cuales puede ser sustituido con 0-5 R_A;

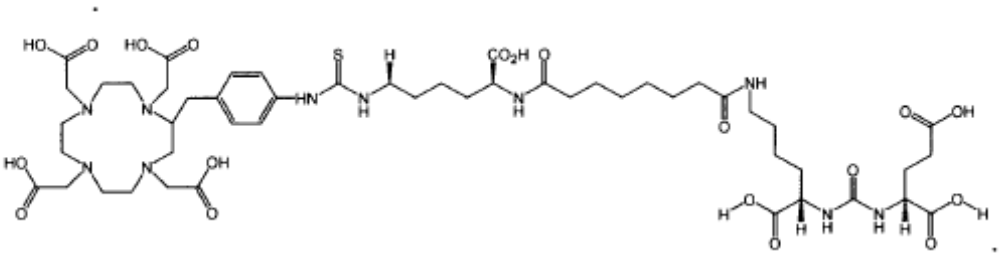
Y es -O-, -S(O)p-, -NH-, -CH=CH-, -NH-CO-, -NH-CO_2-, -CO-NH-, -CO_2-NH-, o un enlace;

p es 0, 1, o 2;

R_A, para cada aparición, es CO_2H.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R" y R^y son H.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula (VII) tiene la siguiente estructura:



4. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende al menos un isótopo radiactivo.

5. El compuesto según la reivindicación 4, en el que el isótopo radiactivo se selecciona del grupo que consiste en Tc-99m, Re-188, Re-186, Ga-68, Cu-64, Y-90, Y-86, Ac-225, Bi-213, In-111, Tc-94m, Sm-153, Ho-166, Lu-177, Cu-67, y Dy-166.

6. El compuesto según la reivindicación 4, para su uso en una composición farmacéutica envasada.

7. El compuesto según la reivindicación 4, para su uso en un procedimiento de obtención de imágenes en un sujeto.

8. El compuesto según la reivindicación 7, para su uso en el diagnóstico de cáncer.

Figura 1

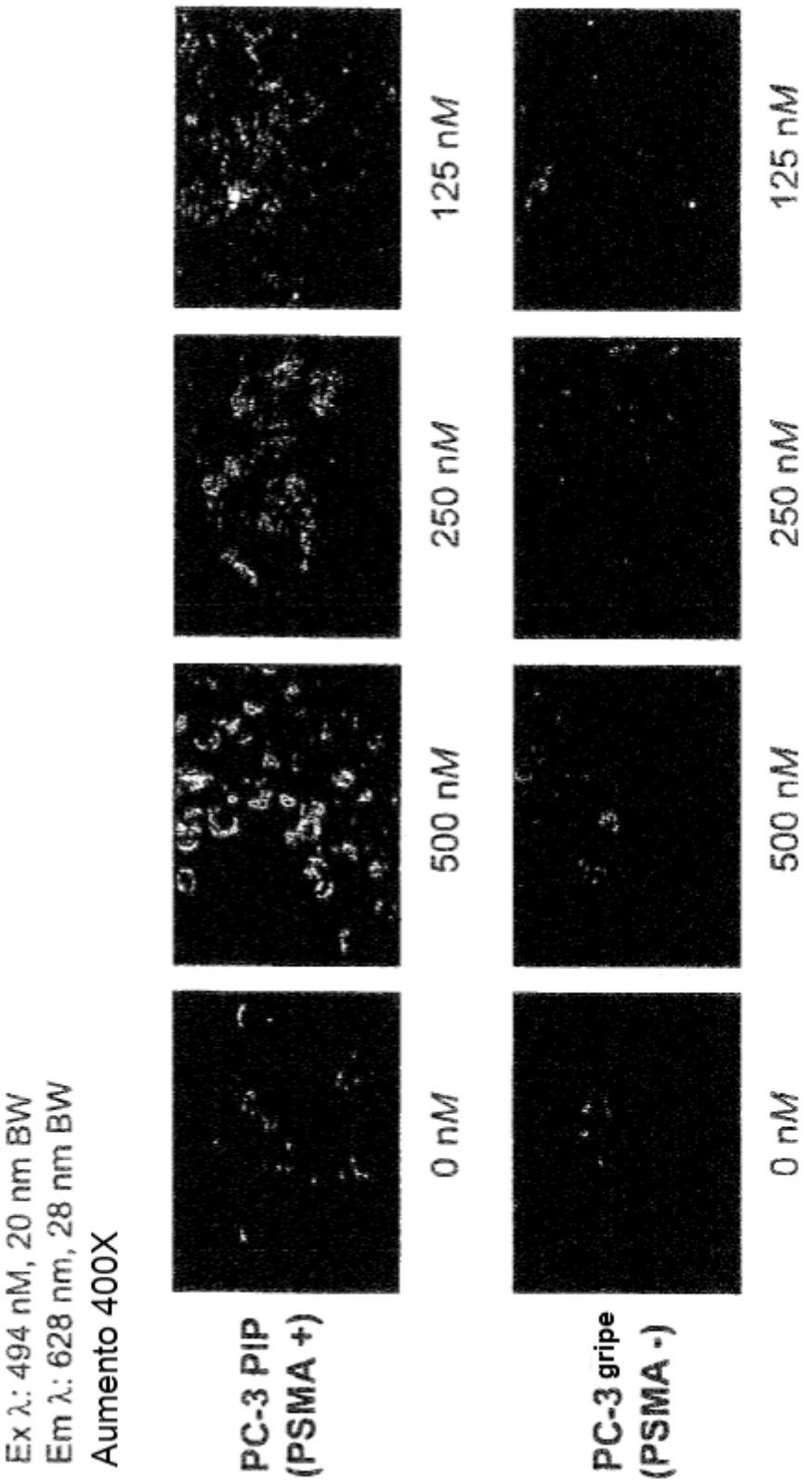

Ex λ: 494 nM, 20 nm BW
Em λ: 628 nm, 28 nm BW
Aumento 400X
PC-3 PIP (PSMA +)
PC-3 gripe (PSMA -)
0 nM
500 nM
250 nM
125 nM

Figura 2

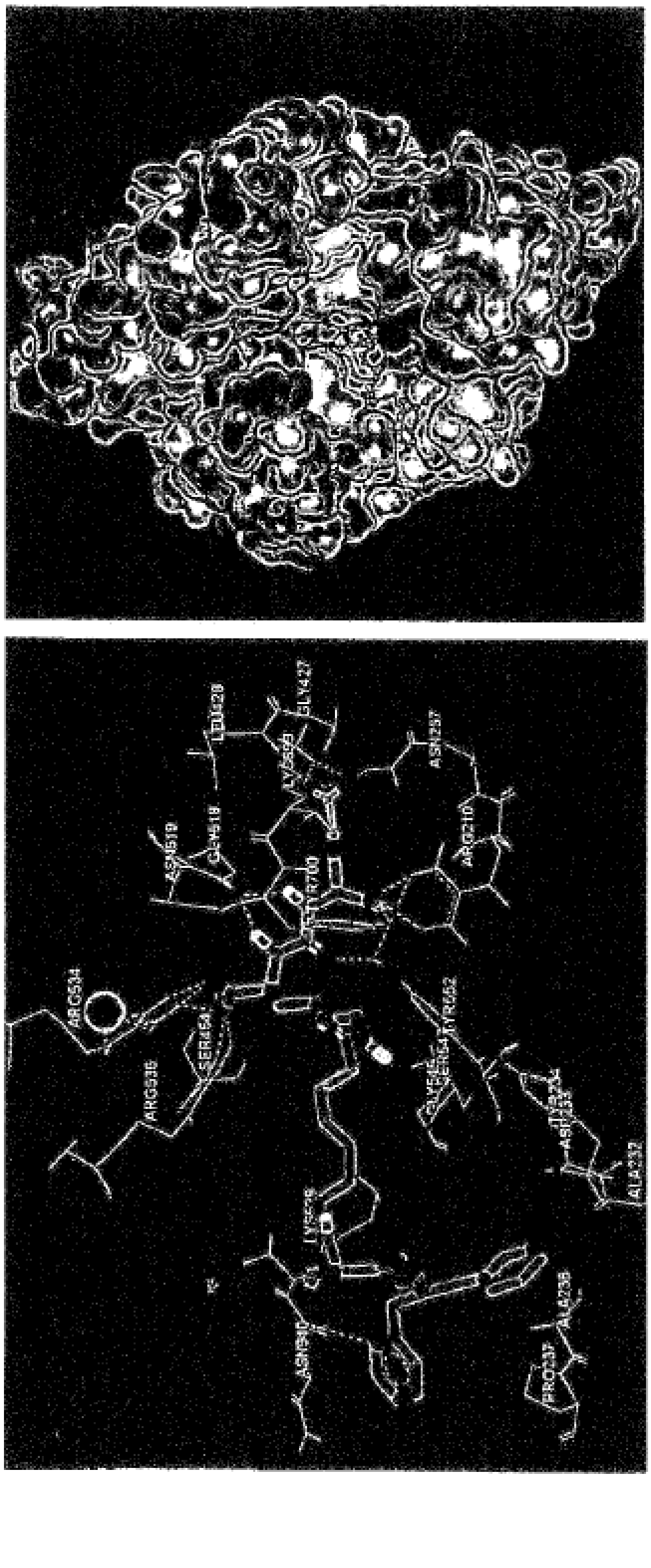

ARG534
ARG536
SER454
ASN519
GLN518
LEU428
GLY427
TYR700
ASN297
ARG210
TYR652
ASN540
ALA236
PRO237
ALA232

Figura 3

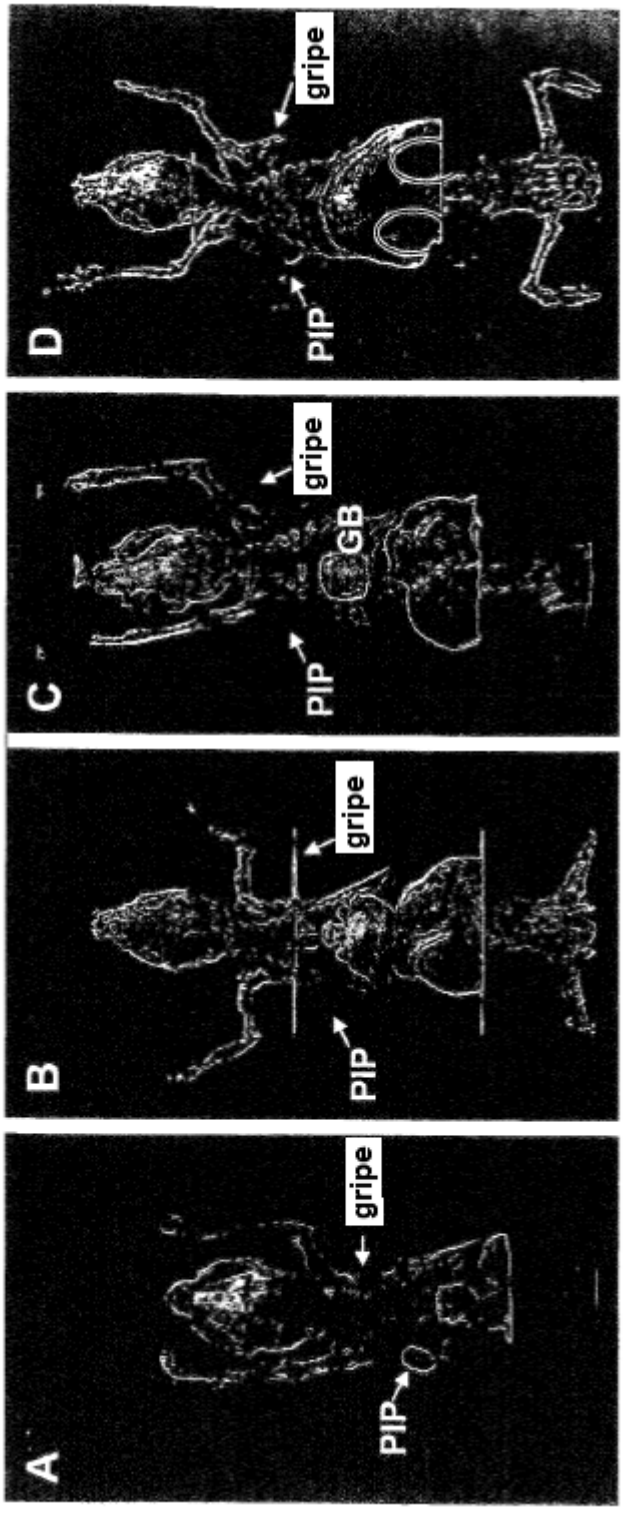


Figura 4

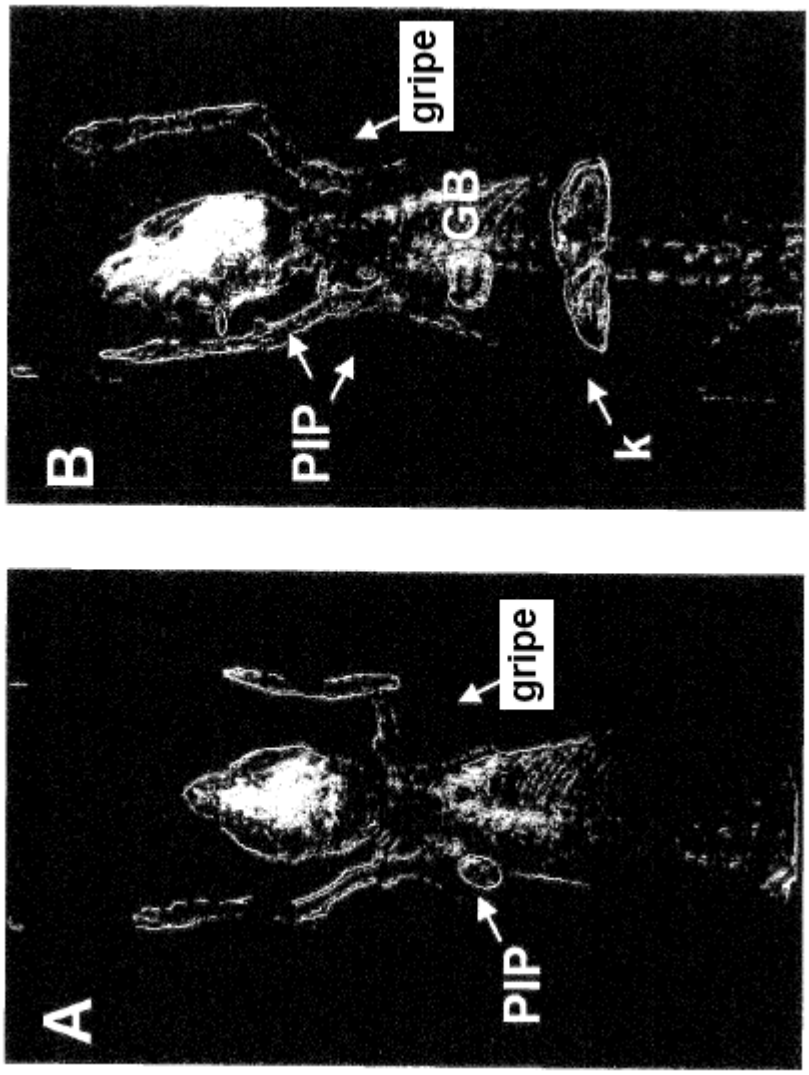


Figura 5

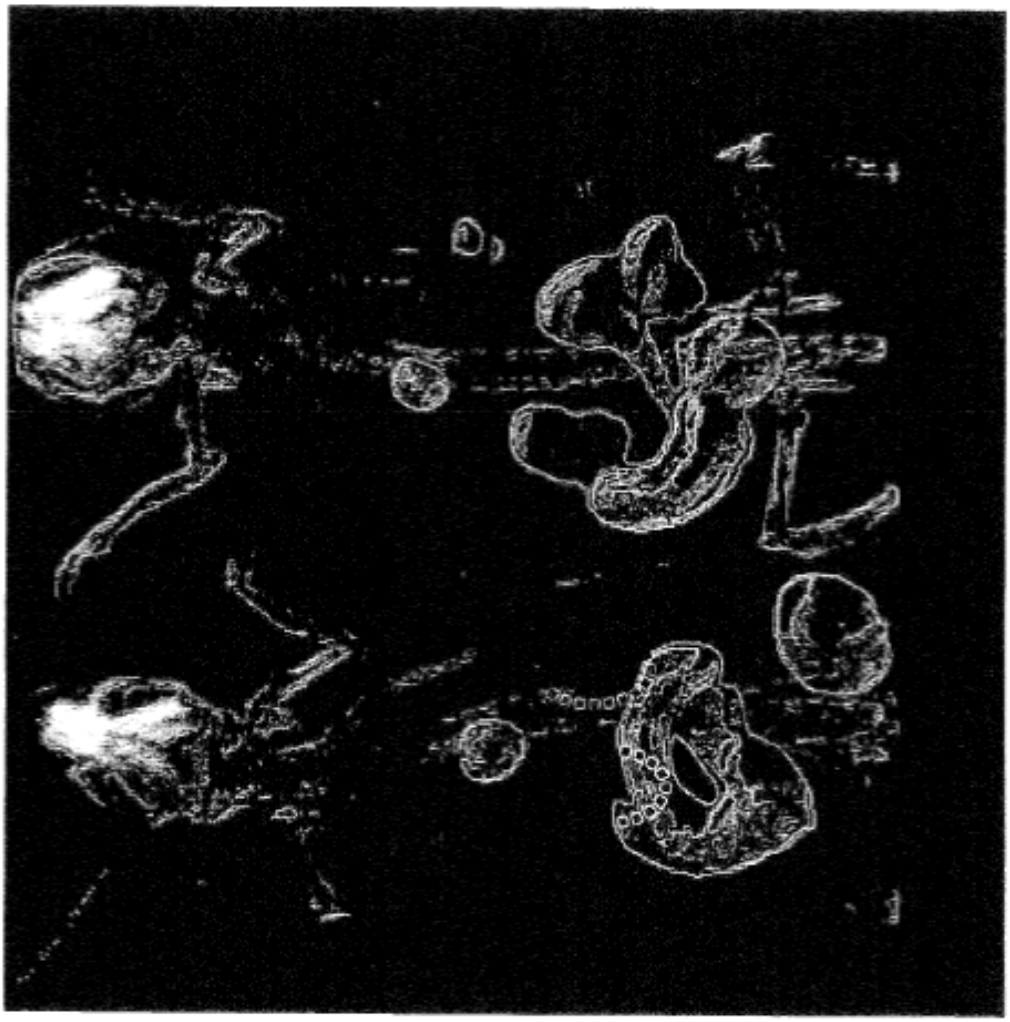
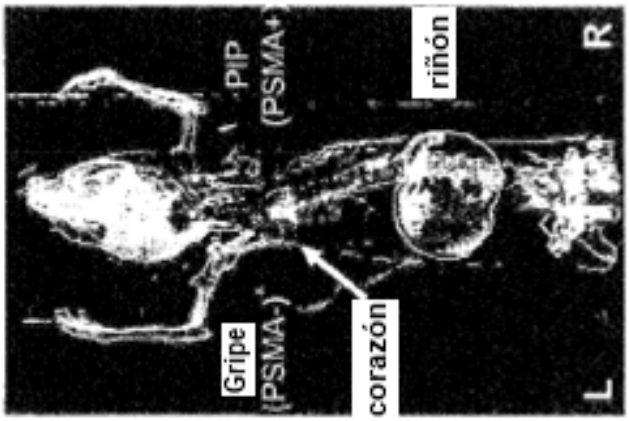



Figura 6