

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 134**

51 Int. Cl.:

A61K 51/04 (2006.01)

A61K 31/41 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2016 PCT/KR2016/012849**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2017 WO17082620**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2016 E 16864546 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3375787**

54 Título: **Derivado peptídico de tiourea, compuesto marcado con radioisótopos que contiene el mismo y composición farmacéutica que contiene el mismo como ingrediente activo para tratar o diagnosticar el cáncer de próstata**

30 Prioridad:

09.11.2015 KR 20150156536

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

26.12.2019

73 Titular/es:

**CELLBION CO., LTD. (100.0%)
6th FL., 103, Daehak-ro, Jongno-gu
Seoul 03080, KR**

72 Inventor/es:

**JEONG, JAE MIN;
MOON, SUNG-HYUN y
LEE, YUN-SANG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 736 134 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivado peptídico de tiourea, compuesto marcado con radioisótopos que contiene el mismo y composición farmacéutica que contiene el mismo como ingrediente activo para tratar o diagnosticar el cáncer de próstata

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a un derivado peptídico de tiourea, un compuesto marcado con radioisótopos que comprende el mismo, y una composición farmacéutica para tratar o diagnosticar el cáncer de próstata que comprende el mismo como un ingrediente activo.

2. Descripción de la técnica relacionada

El cáncer de próstata es uno de los tumores urogenitales más comunes a nivel mundial. En Estados Unidos, aproximadamente 380.000 personas fueron diagnosticadas con cáncer de próstata en 1997, de las cuales 41.800 personas murieron, lo que indica que la tasa de mortalidad de esta enfermedad fue la segunda más alta después del cáncer de pulmón. En Corea, el cáncer de próstata está aumentando rápidamente debido al envejecimiento y la occidentalización de la dieta. Por lo tanto, el diagnóstico y tratamiento temprano por imagenología del cáncer de próstata se ha convertido en un gran problema no solo en Corea sino también en todo el mundo.

El cáncer de próstata comienza a crecer en los tejidos aproximadamente la glándula prostática y, a medida que crece, migra hacia otros órganos importantes, como el pulmón y el hueso. En la etapa inicial, hay pocos síntomas, pero a medida que el cáncer de próstata crece, causa problemas como la compresión uretral y la obstrucción del tracto urinario y, además, migra hacia la columna vertebral o la pelvis con complicaciones graves.

Para el diagnóstico de cáncer de próstata, se han utilizado procedimientos de diagnóstico por imagenología, como la SPECT (Tomografía Computarizada por Emisión de Fotón Único) y la PET (Tomografía por Emisión de Positrones), en donde los cambios bioquímicos que ocurren en las células tumorales se expresan en imágenes tomográficas e imágenes tridimensionales mediante el uso de sustancias marcadas con radioisótopos que emiten rayos gamma o positrones para indicar la presencia de cáncer o su distribución.

Estos procedimientos de diagnóstico por imagenología se han propagado recientemente debido a la mejora de la calidad de las imágenes con el desarrollo de la CT combinada como SPECT-CT/MRI y PET-CT/MRI.

Los radiofármacos utilizados como agente de formación de imágenes para el cáncer de próstata utilizan la unión del ligando a la proteína (antígeno de membrana específico de la próstata: PSMA) expresada específicamente en el cáncer de próstata. La unión de ligando más representativa a PSMA es un derivado peptídico tal como Glu-urea-Lys (GUL) o Glu-urea-Cys (GUC). Por lo tanto, los productos radiofarmacéuticos preparados marcando un radioisótopo a un ligando peptídico de este tipo se pueden usar para obtener imágenes específicas del cáncer de próstata que expresa PSMA con PET o SPECT o para tratar el cáncer de próstata (M Eder, et. al., Bioconjugate Chem 2012, 23:688-697).

Los radioisótopos utilizados para marcar péptidos son principalmente radionúclidos emisores de rayos alfa, radionúclidos emisores de rayos beta, radionúclidos emisores de rayos gamma y radionúclidos emisores de rayos de positrones. Entre ellos, los radionúclidos emisores de rayos alfa y los radionúclidos emisores de rayos beta se utilizan para el tratamiento, y radionúclidos emisores de rayos gamma y radionúclidos emisores de haz de positrones se utilizan para el diagnóstico mediante imagenología de núcleo.

El procedimiento para marcar ligandos con radioisótopos se ejemplifica mediante el procedimiento para unir radioisótopos directamente a ligandos o el procedimiento para combinar agentes quelantes bifuncionales (BFCA) como DTPA, DOTA, TETA, HYNIC, N2S2 y MAG3 al péptido antes de marcar el péptido con radioisótopos por medio de quelación. El procedimiento de unión directa se usa principalmente para unir I-125, que no puede unir varios radioisótopos. Mientras tanto, el procedimiento que utiliza un agente quelante bifuncional (BFCA) puede marcar varios radioisótopos. El tipo de agente quelante bifuncional (BFCA) se selecciona adecuadamente de acuerdo con el ligando, y se ha mejorado la solubilidad del mismo.

Tabla 1

Agentes quelantes bifuncionales (BFCA) usados dependiendo del tipo de ligando peptídico			
Grupo	Péptido	BFCA	Enfermedad dirigida
Análogos de somatostatina (SST)	ocreoítido	DTPATETAHYNIC	tumor (neuroendócrino)
Análogos de somatostatina (SST)	Tyr ³ -ocreoítido (Y3-TETA)	TETAHYNIC	tumor (neuroendócrino)

Agentes quelantes bifuncionales (BFCA) usados dependiendo del tipo de ligando peptídico				
Grupo	Péptido	BFCA	Enfermedad dirigida	
5	Análogos de somatostatina (SST)	Vapreótido (RC-160)	S-S (directo) HYNIC	tumor (neuroendócrino)
	Análogos de BN/GRP		N2S2HYNIC	tumor
	Análogos de VIP		MAG3	tumor
10	Péptidos que contienen RGD/ peptidomiméticos RGD		HYNIC	trombosis
	Análogos de R-MSH		S-S (directo)	tumor (mama, próstata)
	Análogos de SP		DTPA	tumor
15	Péptidos quimiotácticos		HYNIC	Infección/inflamación

En cuanto a la técnica relacionada con los radiofármacos para la formación de imágenes de cáncer de próstata, la solicitud de patente US 2012/0269726 A1 describe un compuesto que comprende un derivado de GUL y una estructura de piridina para marcar el radioisótopo tal como Tc-99m o Re-188. Sin embargo, en esta descripción, un agente quelante bifuncional tal como NOTA o DOTA no está incluido, por lo que los isótopos como el Ga-68 no pueden ser marcados.

La publicación de solicitud de patente WO 2010/014933 A2 describe un derivado de GUL marcado con F-18 o I-125 después de la introducción de halógeno en el anillo de fenilo por unión a tiourea. Sin embargo, en esta descripción, un agente quelante bifuncional tal como NOTA o DOTA tampoco está incluido, por lo que los isótopos metálicos como el Ga-68 no pueden ser marcados.

Los compuestos marcados con isótopos, tales como el yodo o el F-18 descritos anteriormente, son radiofármacos lipófilos. Estos productos farmacéuticos lipófilos se excretan principalmente a través del intestino delgado y grueso a través de la vía biliar, por lo que permanecen en el cuerpo durante mucho tiempo. Por lo tanto, la imagen que muestra la cavidad abdominal interior es muy complicada, lo que indica que es difícil obtener una imagen limpia de una región deseada. Mientras tanto, los medicamentos solubles en agua se excretan a través del riñón, lo que indica que se recolectan solo en el riñón y la vejiga y se excretan rápidamente, luego de lo cual casi no queda radioactividad. Por lo tanto, se puede obtener una imagen limpia de una región deseada.

Los radiofármacos solubles en agua para la formación de imágenes desarrollados hasta ahora son ligandos peptídicos combinados con agentes quelantes bifuncionales. El enlazador que conecta el péptido con el agente quelante bifuncional tiene un enlace amida. Sin embargo, el enlace amida del enlazador puede hidrolizarse mediante peptidasa o enzima lisosomal *in vivo* dependiendo del tipo de ligando. Una vez que el enlazador se rompe por hidrólisis, el agente quelante bifuncional y el ligando peptídico marcado con un radioisótopo se separan entre sí, lo que indica que el radioisótopo no puede ir a la región del cáncer de próstata, lo que conlleva a la dificultad del tratamiento o diagnóstico del cáncer de próstata (Simone Dapp, et al. EJNMMI Res. 2012 Jun 9;2(1):24).

Los presentes inventores intentaron desarrollar productos farmacéuticos radiactivos con estabilidad incrementada que no fuesen fácilmente hidrolizados *in vivo* y una actividad de unión específica al cáncer de próstata. Como resultado, los presentes inventores confirmaron que el derivado preparado conjugando un agente quelante bifuncional con un ligando peptídico específico de próstata a través de un enlazador que no está hidrolizado por una proteasa en suero tenía una estabilidad excelente en suero humano cuando se administra *in vivo*; se unió excelentemente a PSMA expresado competitivamente en cáncer de próstata; y fue excelente en cuanto a la supresión de PSMA en una concentración baja. El compuesto marcado con el radioisótopo anterior también mostró el mismo efecto que el anterior y mostró una alta solubilidad en agua, por lo que puede excretarse en el riñón en lugar de la vía biliar, lo que indica que una imagen clara de la región del cáncer de próstata puede ser obtenida. Por lo tanto, los presentes inventores confirmaron que el derivado de la invención se puede usar eficazmente como una composición farmacéutica para tratar o diagnosticar el cáncer de próstata, conduciendo a la finalización de la presente invención.

Sumario de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un derivado peptídico de tiourea o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de preparación del derivado peptídico de tiourea anterior.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un compuesto marcado preparado coordinando un radioisótopo metálico al derivado de péptido tiourea o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

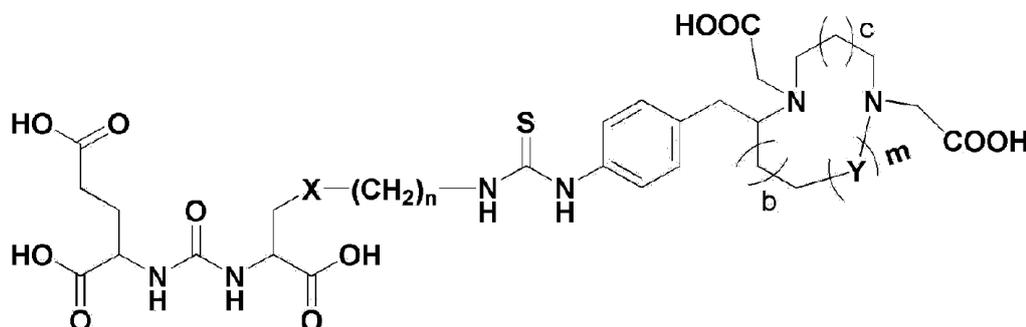
También es un objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica para tratar o diagnosticar el cáncer de próstata que comprende el compuesto marcado anterior como un ingrediente activo.

5 También es un objeto de la presente invención proporcionar un radiofármaco para la formación de imágenes de cáncer de próstata que comprende el derivado de péptido tiourea o su sal farmacéuticamente aceptable como un ingrediente activo.

10 También es un objeto de la presente invención proporcionar un kit para tratar o diagnosticar cáncer de próstata que comprende el derivado de péptido tiourea o su sal farmacéuticamente aceptable como un ingrediente activo.

Para lograr los objetos anteriores, la presente invención proporciona el compuesto representado por la fórmula 1 a continuación o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 [Fórmula 1]



30 En la fórmula 1:

X es enlace simple, -O- o -S-;

n es un número entero de 1 ~ 5;

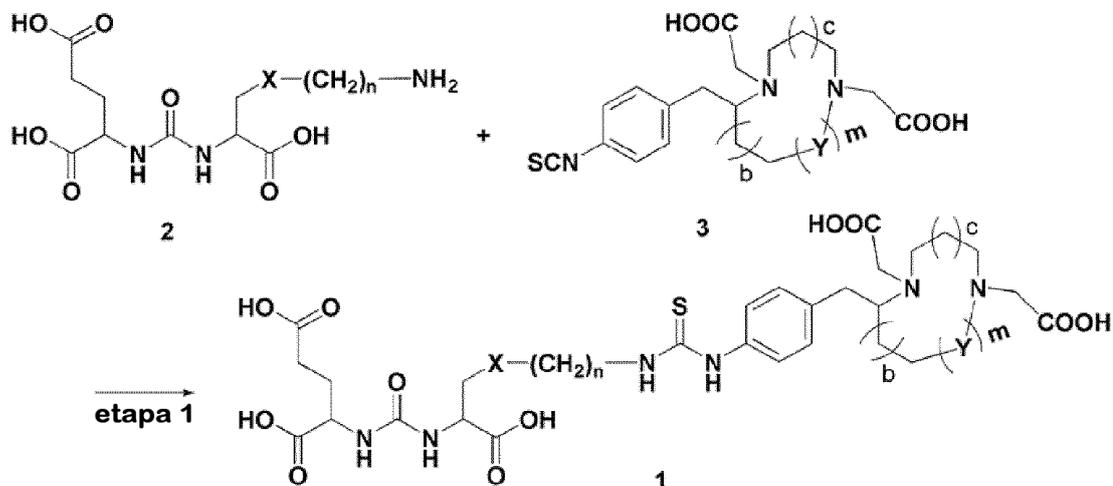
Y es -N(CH₂COOH)(CH₂)_aCH₂CH₂-;

m es un número entero de 1 o 2; y

35 a, b y c son independientemente un número entero de 0 o 1.

La presente invención también proporciona un procedimiento de preparación del compuesto representado por la fórmula 1 que comprende la etapa de preparación del compuesto representado por la fórmula 1 haciendo reaccionar el compuesto representado por la fórmula 2 y el compuesto representado por la fórmula 3 (etapa 1), como se muestra en la fórmula de reacción 1 a continuación.

40 [Fórmula de Reacción 1]



65 En la fórmula de reacción 1:

X, n, Y, m, a, b y c son como se definen en la fórmula 1.

Además, la presente invención proporciona un compuesto marcado preparado coordinando un radioisótopo metálico al derivado de péptido tiourea o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para tratar o diagnosticar cáncer de próstata que comprende el compuesto marcado anterior como un ingrediente activo.

10 La presente invención también proporciona un radiofármaco para la formación de imágenes de cáncer de próstata que comprende el compuesto representado por la fórmula 1 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo como un ingrediente activo.

15 Además, la presente invención proporciona un kit para tratar o diagnosticar el cáncer de próstata que comprende el compuesto representado por la fórmula 1 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo como un ingrediente activo.

Efecto ventajoso

20 El derivado peptídico de tiourea de la presente invención es excelente en cuanto a estabilidad en suero humano cuando se administra *in vivo* y no solo es excelente en la unión a PSMA expresado de manera competitiva en cáncer de próstata sino que también es excelente en cuanto a supresión de PSMA en una concentración baja; y el derivado se excreta en el riñón en lugar de la vía biliar debido a su alta solubilidad en agua, de modo que se acumula en los tejidos del cáncer de próstata y emite radiación a la región del cáncer de próstata, lo que indica que el derivado se puede usar eficazmente como una composición farmacéutica. Para el tratamiento y diagnóstico del cáncer de próstata.

25

Breve descripción de los dibujos

30 La aplicación de las realizaciones preferentes de la presente invención se entiende mejor con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

30

Las Figuras 1a-1c son gráficos que ilustran los resultados de TLC (fase móvil: Na₂CO₃ 0,1 M, fase estacionaria: ITLC) de Ga-68-NOTA-GUL de acuerdo con la presente invención, en donde la Figura 1a muestra Ga-68 no marcado, la Figura 1b muestra Ga-68-NOTA-GUL, y la Figura 1c muestra Ga-68-NOTA-GUL cultivada con suero humano durante 2 horas.

35

Las Figuras 2a-2c son gráficos que ilustran los resultados de TLC (fase móvil: Na₂CO₃ 0,1 M, fase estacionaria: ITLC) de Ga-68-DOTA-GUL de acuerdo con la presente invención, en donde la Figura 2a muestra Ga-68 no marcado, la Figura 2b muestra Ga-68-DOTA-GUL, y la Figura 2c muestra Ga-68-DOTA-GUL cultivado con suero humano durante 2 horas.

40

La Figura 3a es un gráfico que ilustra la tasa de inhibición de la unión entre células 22Rv1 positivas para PSMA e I-125-MIP-1072 de acuerdo con la concentración de Ga-NOTA-SCN-GUL de la presente invención, y la Figura 3b es un gráfico que ilustra la IC₅₀ de Ga-NOTA-SCN-GUL analizada por análisis de regresión no lineal ($y = -17,77 \ln(x) - 266,57$, R² = 0,998), IC₅₀ = 18,3 nM).

45

Las Figuras 4a-4b son las imágenes PET obtenidas una hora después de la inyección intravenosa de Ga-68-NOTA-SCN-GUL de la invención GUL en el ratón trasplantado con células 22Rv1. En la Figura 4a, el cáncer 22Rv1 se muestra en la parte inferior izquierda, pero en la Figura 4b, Ga-68-NOTA-SCN-GUL no se observa en la región del cáncer después de la inyección de MIP-1072.

50

Mejor modo

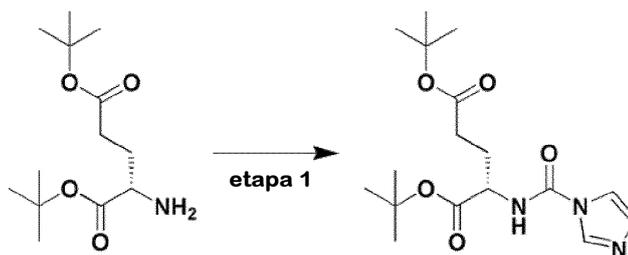
55 En lo sucesivo, los ejemplos y ejemplos experimentales de la presente invención se describirán y se ejemplificarán específicamente. Sin embargo, la presente invención no está limitada por los siguientes ejemplos y ejemplos experimentales.

Ejemplo 1: Preparación de ácido (S)-2-(3-((S)-1-carboxi-5-(3-(4-((1,4,7-tris(carboximetil)-1,4,7-triazonano-2-il)metil)fenil)tioureido)pentil)ureido)pentanodioico (GUL-SCN-NOTA)

60 Etapa 1: Preparación de (S)-di-terc-butil 2-(1H-imidazol-1-carboxamido)pentanedioato

65

5



10

Se disolvió clorhidrato de L-di-terc-butil glutamato (1,50 g, 5,1 mmoles) en diclorometano (15 ml) y luego se enfrió a 0°C, a lo que se añadió trietilamina (1,74 ml, 12,5 mmoles) y 4-(dimetilamino)piridina. La mezcla se agitó durante 5 minutos, luego se le añadió 1,1'-carbonyldiimidazol (981 mg, 6,05 mmol). La temperatura de la mezcla se elevó a temperatura ambiente, seguido de agitación durante 18 horas. Se añadieron 30 ml de diclorometano para la dilución. La mezcla se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio (10 ml), agua (2 x 10 ml) y salmuera (10 ml). Luego, la capa orgánica se deshidrató con sulfato de sodio. La mezcla se filtró y el filtrado se secó a presión reducida, seguido del tratamiento de solución de hexano/acetato de etilo. Como resultado, se obtuvo un material sólido blanco. El material sólido blanco obtenido se lavó con hexano (50 ml) y el material sólido blanco final se analizó mediante análisis instrumental.

20

Rendimiento: 1,44 g, 80%;

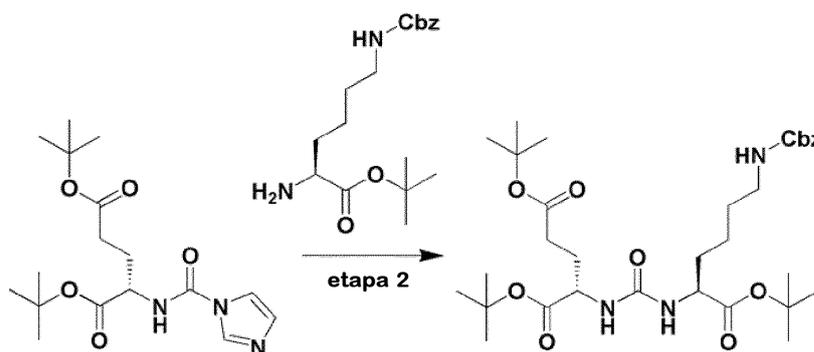
¹H-NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ 8,29 (s, 1H), 7,73 (s, 1H), 7,05 (s, 1H), 7,01 (s, 1H), 4,24 (m, 1H), 2,36 (t, J = 7,26 Hz, 2H), 2,03 (m, 1H), 1,87 (m, 1H), 1,42 (s, 9H), 1,39 (s, 9H).

Espectro de masas (ESI⁺), *m/z* = 354 [M+H]⁺.

25

Etapa 2: Preparación de (9S, 13S)-tri-terc-butilo 3,11-dioxo-1-fenil-2-oxa-4,10,12-triazapentadecan-9, 13, 15-tricarboxilato

30



35

40

(S)-di-terc-butil 2-(1H-imidazol-1-carboxamido)pentanedioato (780 mg, 2,208 mmol) preparado en la etapa 1 se disolvió en diclorometano (7,8 ml) y luego se enfrió a 0°C, a la que se añadieron trietilamina (0,615 ml, 4,417 mmol) y trifluorometanosulfonato de metilo (MeOTf) (0,252 ml, 2,230 mmol). La temperatura de la mezcla se elevó a temperatura ambiente mientras se agitaba, seguido de agitación adicional durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se añadió con (S)-terc-butil-2-amino-6-(((benciloxi)carbonil)amino)hexanoato (743 mg, 2,208 mmol) y se calentó a 40°C, seguido de agitación durante la noche. Una vez completada la reacción, la solución se secó a presión reducida. Luego, se obtuvo un producto sólido utilizando éter y hexano.

45

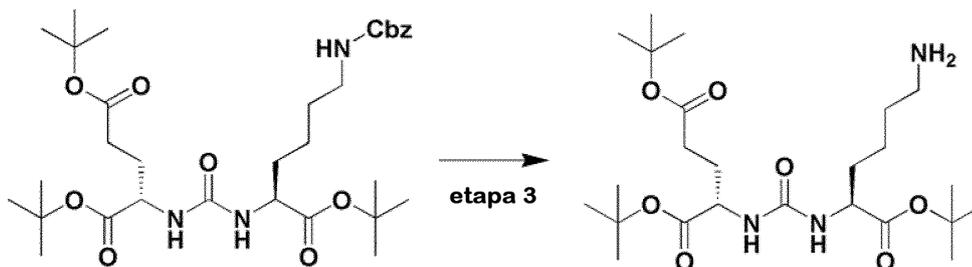
50

Rendimiento: 1,18 g, 86%;

Espectro de masas (ESI⁺), *m/z* = 622 [M+H]⁺.

Etapa 3: Preparación de (S)-di-terc-butil 2-(3-((S)-6-amino-1-terc-butoxi-1-oxohexan-2-il)ureido)pentanedioato

55



60

65

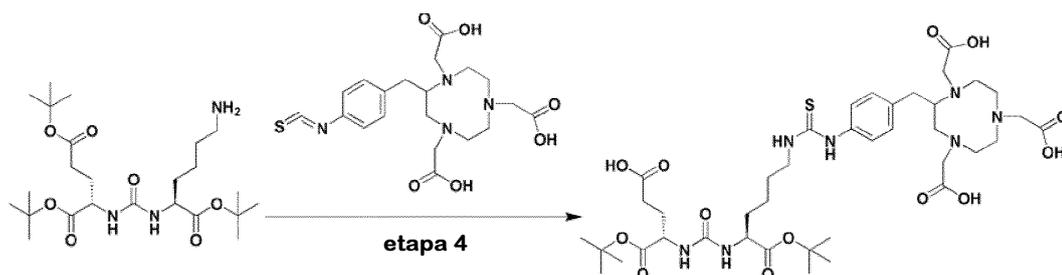
Se añadieron formiato de amonio (314 mg, 4,986 mmol) y 10% en peso de paladio carbono (100 mg) a la solución de etanol (5 ml) de (9S, 13S)-tri-*tert*-butilo 3,11-dioxo-1-fenil-2-oxa-4,10,12-triazapentadecan-9, 13, 15-tricarboxilato (310 mg, 0,499 mmol) preparado en la etapa 2, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. Una vez completada la reacción, la mezcla se filtró usando Celite 545 y luego se lavó con acetato de etilo (25 ml x 3). Se obtuvo un producto sólido blanco destilando el filtrado a presión reducida.

Rendimiento: 243 mg, 98%.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ 8,43 (s, 1H), 8,10-7,10 (br, 1H), 6,50 (m, 2H), 4,01 (m, 1H), 3,92 (m, 1H), 2,69 (m, 2H), 2,17 (m, 2H), 1,83 (m, 1H), 1,70-1,49 (m, 4H), 1,38 (m, 27H), 1,29 (m, 2H).

Espectro de masas (ESI⁺), *m/z* = 488 [M+H]⁺.

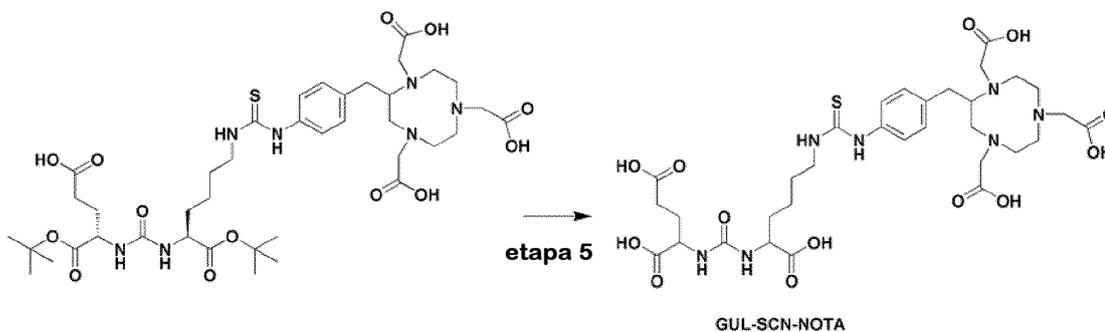
Etapa 4: Preparación de ácido 2,2',2''-(2-(4-(3-((S)-6-(*tert*-butoxi)-5-(3-((S)-1,5-di-*tert*-butoxi-1,5-dioxopentano-2-il)ureido)-6-oxohexil)tioureido)bencil)-1,4,7-triazonano-1,4,7-tritil)triacético



(S)-di-*tert*-butil 2-(3-((S)-6-amino-1-*tert*-butoxi-1-oxohexan-2-il)ureido)pentanedioato (47,8 mg, 0,0982 mmol), ácido 2,2',2''-(2-(4-isotiocianatobencil)-1,4,7-triazonano-1,4,7-tritil)triacético (SCN-Bz-NOTA, 55 mg, 0,0982 mmol), y trimetilamina (0,068 ml, 0,491 mmol) preparados en la etapa 3 se disolvieron en cloroformo (1,0 ml), seguido de agitación a temperatura ambiente durante la noche. Una vez completada la reacción, el solvente se secó a presión reducida. Un producto fue confirmado por LC/MC.

Espectro de masas (ESI⁺), *m/z* = 939 [M+H]⁺.

Etapa 5: Preparación de ácido (S)-2-(3-((S)-1-carboxi-5-(3-(4-((1,4,7-tris(carboximetil)-1,4,7-triazonano-2-il)metil)fenil)tioureido)pentil)ureido)pentanodioico

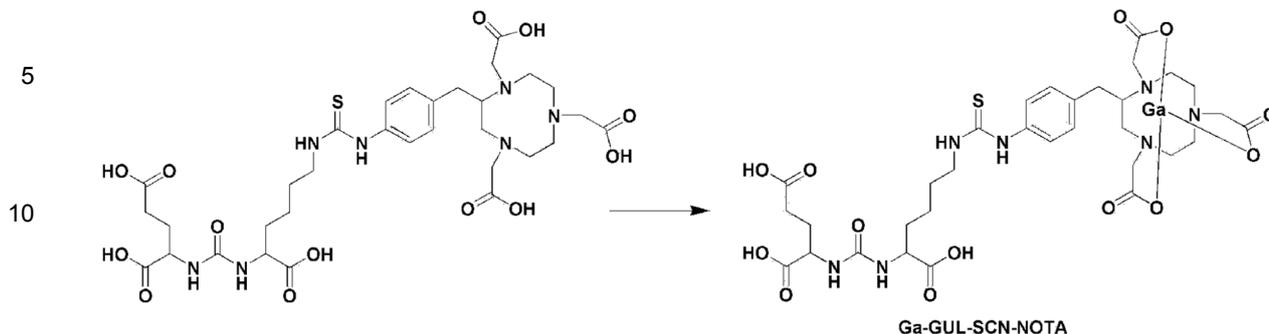


El ácido 2,2',2''-(2-(4-(3-((S)-6-(*tert*-butoxi)-5-(3-((S)-1,5-di-*tert*-butoxi-1,5-dioxopentano-2-il)ureido)-6-oxohexil)tioureido)bencil)-1,4,7-triazonano-1,4,7-tritil)triacético preparado en la etapa 4 se disolvió en ácido trifluoroacético/diclorometano (v/v 1/1, 2,0 ml), seguido de agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla se secó a presión reducida, seguido de purificación por HPLC usando MeCN y agua destilada para dar GUL-NOTA.

Rendimiento: 47,8 mg, 63% (rendimiento global en 2 etapas).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ 12,4 (br, 6H), 9,45 (s, 1H), 7,69 (s, 1H), 7,38 (d, J = 8,10 Hz, 2H), 7,18 (d, J = 8,16 Hz, 2H), 6,76 ~ 6,41 (br, 2H), 6,30 (m, 2H), 4,12-2,61 (m, 22H), 2,19 (m, 2H), 1,86 (m, 1H), 1,74-1,51 (m, 4H), 1,29 (m, 2H).

Espectro de masas (ESI⁺), *m/z* = 770 [M+H]⁺.

Ejemplo 2: Preparación de Ga-NOTA-SCN-GUL

15

El GUL-NOTA (47,8 mg, 0,0621 mmol) preparado en el Ejemplo 1 se disolvió en un tampón de NaOAc 1,0 M (2,0 ml, pH de 5,6) junto con GaCl₃ 0,5 M (1,242 ml, 0,621 mmol) disuelto en pentano, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 8 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm y el filtrado se separó por cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo: n-hexano = 1:1, v/v). Como resultado, se obtuvo un compuesto sólido blanco.

20

Rendimiento: 268 mg, 58%.

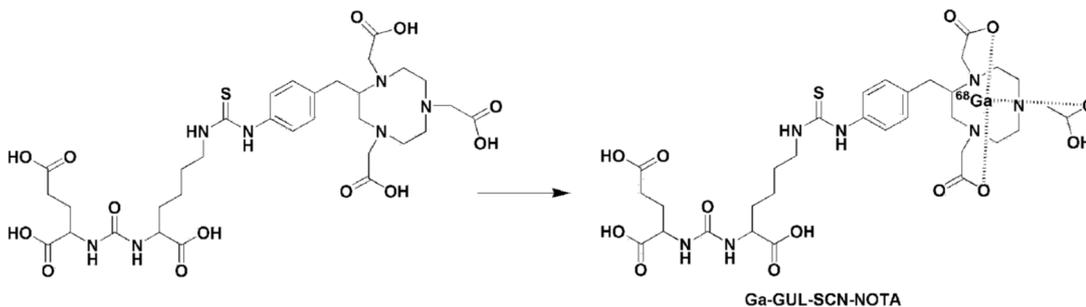
¹H-NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ 12,4 (br, 3H), 9,45 (s, 1H), 7,69 (s, 1H), 7,38 (d, J = 8,10 Hz, 2H), 7,18 (d, J = 8,16 Hz, 2H), 6,76 ~ 6,41 (br, 2H), 6,30 (m, 2H), 4,12-2,61 (m, 22H), 2,19 (m, 2H), 1,89 (m, 1H), 1,74-1,51 (m, 4H), 1,29 (m, 2H).

25

Espectro de masas (ESI⁺), *m/z* = 837 [M+H]⁺.

Ejemplo 3: Preparación de Ga-68-NOTA-SCN-GUL

30



40

Se disolvió Ga-68-Cl₃ (200 µl, 111 MBq) en HCl 0,1 M, que se añadió a un tampón de acetato de sodio 1 M (pH = 5,6, 200 µl). Se añadió una solución de MeCN que contenía GUL-NOTA (10 µl, 1 mg/ml) preparado en el Ejemplo 1, que se agitó vigorosamente durante 1 minuto, seguido de reacción a temperatura ambiente durante 10 minutos. La eficiencia de marcado se calculó realizando ITLC-SG utilizando Na₂CO₃ 0,1 M como solvente de desarrollo. En este momento, el Ga-68-NOTA-SCN-GUL marcado se movió a la parte superior (R_f=1,0) (Figura 1a) y el Ga-68 no marcado permaneció en el origen (R_f=0,0) (Figura 1b). Como resultado, la eficiencia de marcado fue más del 99%.

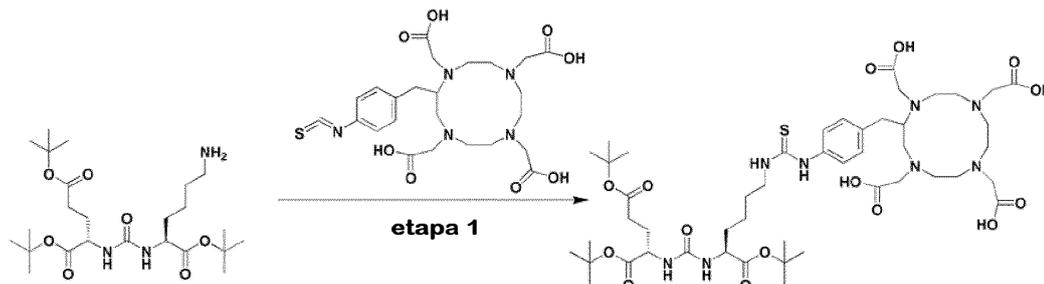
45

Ejemplo 4: Preparación de ácido (S)-2-(3-((S)-1-carboxi-5-(3-(4-((1,4,7,10-tetrakis(carboximetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-2-il)metil)fenil)tioureido)pentil)ureido)pentanodioico (GUL-SCN-DOTA)

50

Etapas 1: Preparación de ácido 2,2',2''-(2-(4-(3-((S)-6-(terc-butoxi)-5-(3-((S)-1,5-di-terc-butoxi-1,5-dioxopentano-2-il)ureido)-6-oxohexil)tioureido)encil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetriil)tetraacético

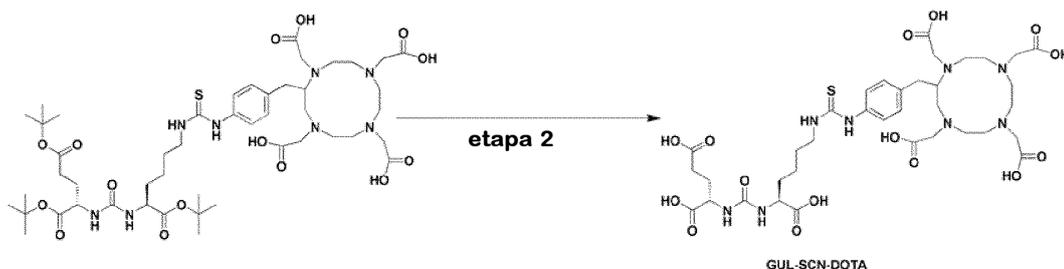
55



65

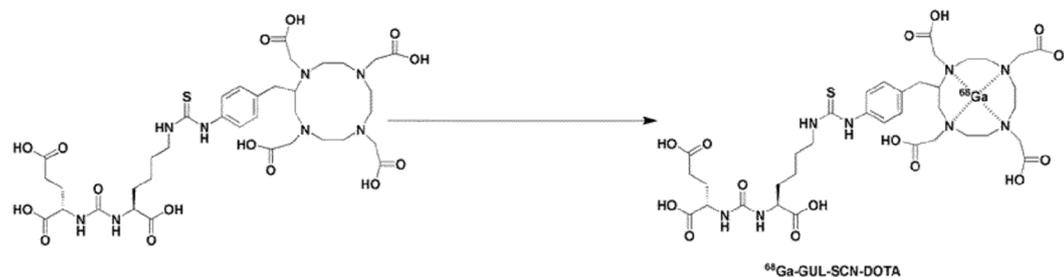
(S)-di-terc-butil 2-(3-((S)-6-amino-1-terc-butoxi-1-oxohexan-2-il)ureido)pentanedioato (30 mg, 0,0615 mmol) preparado en la etapa 3 del Ejemplo 1, ácido 2,2',2"-2-(4-isotiocianatobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetrail)tetraacético (SCN-Bz-DOTA, 50 mg, 0,0727 mmol) y trimetilamina (0,043 ml, 0,308 mmol) se disolvieron en cloroformo (1,0 ml), seguido de agitación a temperatura ambiente. El solvente se secó a presión reducida y el peso molecular del producto final se calculó por LC/MS. Espectro de masas (ESI⁺), *m/z* = 1040 [M+H]⁺ observado.

Etapa 2: Preparación de ácido (S)-2-(3-((S)-1-carboxi-5-(3-(4-((1,4,7,10-tetrakis(carboximetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-2-il)metil)fenil)tioureido)pentil)ureido)pentanodioico



El ácido 2,2',2"-2-(4-(3-((S)-6-(terc-butoxi)-5-(3-((S)-1,5-di-terc-butoxi-1,5-dioxopentano-2-il)ureido)-6-oxohexil)tioureido)bencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetrail)tetraacético preparado en la etapa 1 se disolvió en 2,0 ml de solución de TFA/DCM (v/v: 1/1), seguido de agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se secó a presión reducida. El producto se lavó con DC que contiene 10% de MeOH y, como resultado, se obtuvo GUL-DOTA como un polvo blanco con un rendimiento del 43%. El peso molecular del producto se calculó por LC/MS. Espectro de masas (ESI⁺), *m/z* = 871 [M+H]⁺ observado.

Ejemplo 5: Preparación de Ga-68-DOTA-SCN-GUL



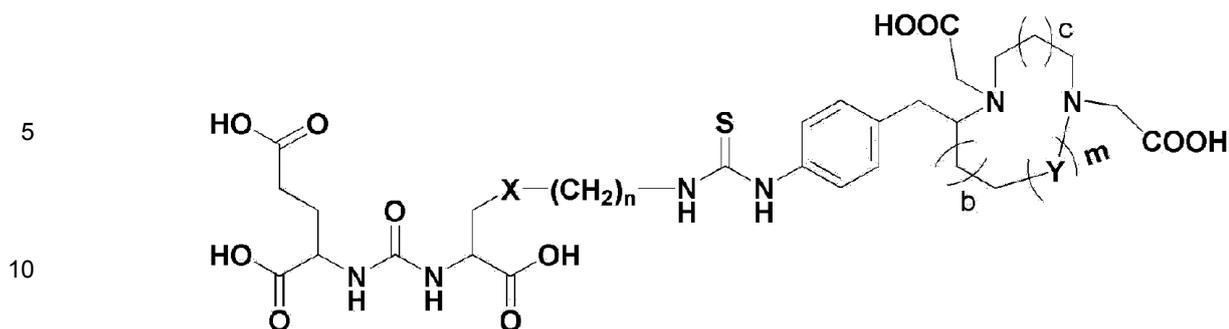
Se le añadió una solución de MeCN que contenía GUL-DOTA (10 µl, 1 mg/ml) preparado en el Ejemplo 4, que se agitó vigorosamente durante 1 minuto, seguido de reacción a 95°C durante 10 minutos. La eficiencia de marcado se calculó realizando ITLC-SG utilizando Na₂CO₃ 0,1 M como solvente de desarrollo. En este momento, el Ga-68-DOTA-SCN-GUL marcado se movió a la parte superior (R_f=1,0) (Figura 2a) y el Ga-68 no marcado permaneció en el origen (R_f=0,0) (Figura 2b). Como resultado, la eficiencia de marcado fue más del 95%.

Descripción de las realizaciones preferentes

En lo sucesivo, la presente invención se describe en detalle.

La presente invención proporciona el compuesto representado por la fórmula 1 a continuación o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[Fórmula 1]



En la fórmula 1:

X es enlace simple, -O- o -S-;

n es un número entero de 1 ~ 5;

Y es $-N(CH_2COOH)(CH_2)_aCH_2CH_2-$,

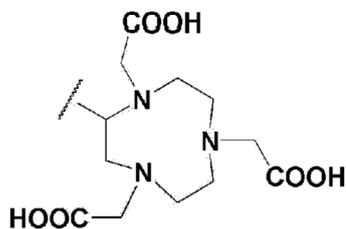
m es un número entero de 1 o 2; y

a, b y c son independientemente un número entero de 0 o 1.

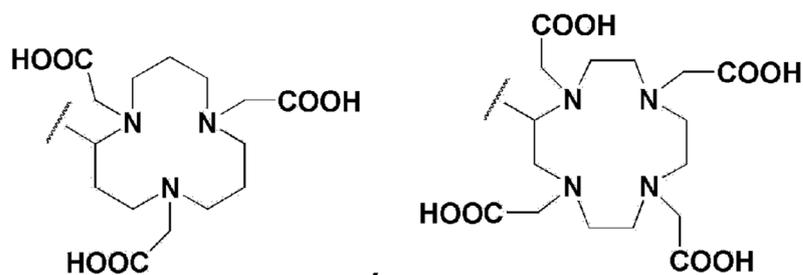
El compuesto representado por la fórmula 1 de la presente invención tiene la estructura en la que un ligando peptídico a PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata) expresado específicamente en cáncer de próstata se une a un agente quelante bifuncional adecuado para marcar con un radioisótopo a través de un enlazador que no es hidrolizado por la proteasa sin enlace amida.

El ligando peptídico anterior es capaz de unirse a PSMA expresado específicamente en el cáncer de próstata. El ácido glutámico-urea-lisina, el ácido glutámico-urea-cisteína o el ácido glutámico-urea-serina se usa preferentemente en la presente memoria descriptiva.

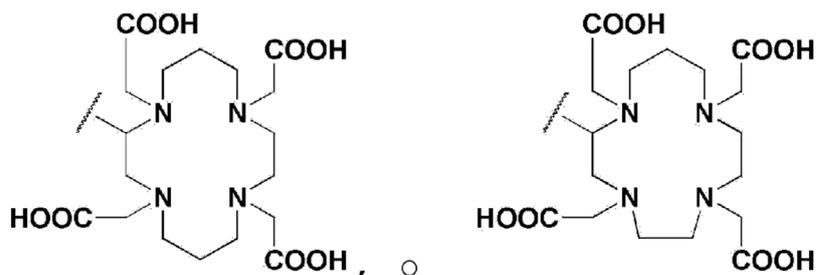
El agente quelante bifuncional es una sustancia capaz de marcar un radioisótopo. En la presente memoria descriptiva:



(NOTA),



(DOTA),



se usa preferentemente y NOTA (ácido 1,4-7-triazaciclononano-1,4,7-triacético) o DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético) es más preferido.

El derivado peptídico de tiourea representado por la fórmula 1 de la presente invención se puede ejemplificar preferentemente mediante los siguientes compuestos:

- (1) ácido 2-(3-(1-carboxi-5-(3-(4-((1,4,7-tris(carboximetil)-1,4,7-triazonano-2-il)metil)fenil)tioureido)fenil)ureido)pentanodioico (GUL-SCN-NOTA); y
- (2) ácido 2-(3-(1-carboxi-5-(3-(4-((1,4,7,10-tetrakis(carboximetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-2-il) metil)fenil)tioureido)pentil)ureido)pentanodioico (GUL-SCN-DOTA).

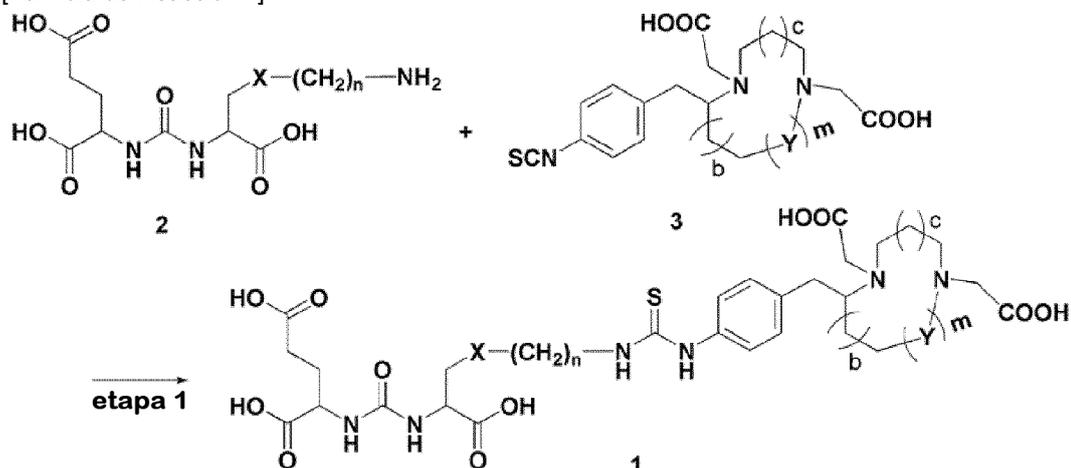
El compuesto representado por la fórmula 1 de la presente invención se puede usar como la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, en la que la sal es preferentemente una sal de adición de ácido formada por ácidos libres farmacéuticamente aceptables. En la presente memoria descriptiva, la sal farmacéuticamente aceptable indica cualquier sal de adición orgánica o inorgánica del compuesto base representado por la Fórmula 1 que sea relativamente no tóxica para un paciente y que tenga actividad no dañina cuyo efecto secundario no pueda reducir ningún efecto positivo de dicho compuesto base representado por la fórmula 1. Independientemente de que sea inorgánico u orgánico, se puede usar un ácido libre si es farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos del ácido libre inorgánico incluyen ácido clorhídrico, ácido bórico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido perclórico y ácido fosfórico. Los ácidos orgánicos libres disponibles se ejemplifican con ácido cítrico, ácido acético, ácido láctico, ácido málico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido galacturónico, ácido embónico, ácido glutámico, ácido aspártico, ácido oxálico, ácido málico (D) o (L), ácido maleico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 4-toluensulfónico, ácido salicílico, ácido cítrico, ácido benzoico y ácido malónico. La sal de la presente memoria descriptiva también incluye sales de metales alcalinos (sal de sodio, sal de potasio, etc.) y sales de metales alcalinotérreos (sal de calcio, sal de magnesio, etc.). Por ejemplo, como sales de adición de ácido se pueden incluir acetato, aspartato, benzato, besilato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, borato, camcilito, citrato, edisilato, esilato, formiato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hexafluorofosfato, hibenzato, clorhidrato/cloruro, bromhidrato/bromuro, hidroyoduro/yoduro, isetionato, lactato, malato, maliato, malonato, metilato, metilsulfato, naftilo, 2-nafsilato, nicotinato, nitrato, orotato, oxalato, palmitato, pamotato, fosfato/hidrógeno fosfato/dihidrógeno fosfato, sacarato, estearato, succinato, tartrato, tosilato, trifluoroacetato, aluminio, arginina, benzatina, calcio, colina, dietilamina, diolamina, glicina, lisina, magnesio, meglumina, olamina, potasio, sodio, tetetamina y sal de zinc. Entre ellos, se prefiere clorhidrato o trifluoroacetato.

El compuesto representado por la fórmula 1 de la presente invención incluye no solo sales farmacéuticamente aceptables, sino también todas las sales, isómeros, hidratos y solvatos que pueden prepararse por medio del procedimiento convencional.

La sal de adición en la presente invención se puede preparar por medio del procedimiento convencional conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el compuesto de fórmula 1 se disuelve en un solvente orgánico miscible con agua, como la acetona, el metanol, etanol o acetonitrilo, a los que se agrega una disolución acuosa excesiva de ácido orgánico o ácido del ácido inorgánico para inducir la precipitación o la cristalización. Luego, el solvente o el exceso de ácido se evapora de la mezcla, seguido de secado de la mezcla para dar sal de adición o filtrar por succión la sal precipitada para dar lo mismo.

La presente invención también proporciona un procedimiento de preparación del compuesto representado por la fórmula 1 que comprende la etapa de preparación del compuesto representado por la fórmula 1 haciendo reaccionar el compuesto representado por la fórmula 2 y el compuesto representado por la fórmula 3 (etapa 1), como se muestra en la fórmula de reacción 1 a continuación.

[Fórmula de Reacción 1]



En la fórmula de reacción 1:

X, n, Y, m, a, b y c son como se definen en la fórmula 1).

En lo sucesivo, el procedimiento de preparación de la presente invención se describe con más detalle.

De acuerdo con el procedimiento de preparación de la presente invención, el compuesto representado por la fórmula 1 se prepara haciendo reaccionar el grupo amino (-NH₂) del compuesto representado por la fórmula 2, que es el derivado peptídico con isotiocianato (-N=C=S) del compuesto representado por la fórmula 3 en presencia de una base.

Si el extremo del resto de derivado peptídico unido a PSMA expresado en cáncer de próstata es -OH o -SH, se puede realizar adicionalmente una etapa de introducción del resto de alquilamina C₁ ~ C₅.

En este momento, la base de la presente invención se ejemplifica mediante bases orgánicas tales como trietilamina (TEA), N,N-diisopropiletilamina (DIPEA), 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-indeseno (DBU), y piridina; o bases inorgánicas tales como t-butoxido de sodio, t-butoxido de potasio, hidróxido de sodio, carbonato de sodio, carbonato de potasio, carbonato de cesio e hidruro de sodio. La base se puede usar en cantidades equivalentes o en exceso, sola o en combinación, pero no siempre se limita a las mismas.

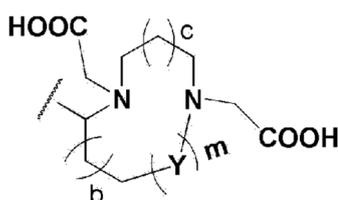
El solvente de reacción utilizado en la presente memoria descriptiva se ejemplifica por cloroformo, dimetil formamida (DMF), tolueno, dimetil acetamida (DMA), dimetil sulfóxido (DMSO), cloruro de metileno, dicloroetano, agua, acetato de etilo, acetonitrilo; alcoholes inferiores que incluyen isopropanol, metanol, etanol, propanol y butanol; y solventes de éter que incluyen tetrahidrofurano (THF), dioxano, éter etílico y 1,2-dimetoxietano. Los solventes anteriores pueden usarse independientemente o en combinación. Además, la temperatura de reacción es preferentemente la temperatura ambiente, pero puede ajustarse de acuerdo con el progreso de la reacción, y no limitarse a la misma.

De acuerdo con el procedimiento de preparación de la presente invención, el compuesto representado por la fórmula 1 puede prepararse fácilmente haciendo reaccionar el grupo amina (-NH₂) al final del derivado peptídico y el isotiocianato del agente quelante bifuncional directamente en una sola etapa bajo la condición leve.

Además, la presente invención proporciona un compuesto marcado preparado coordinando un radioisótopo metálico al compuesto representado por la fórmula 1 anterior o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El radioisótopo metálico de la presente invención es preferentemente ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ¹¹¹In, ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu, o ^{117m}Sn.

El radioisótopo metálico se marca con alta eficacia cuando una proteína se marca con un nucleido de emisión de positrones producido en un generador utilizando un agente quelante bifuncional, en particular:



(Y, m, b, y c se definen como la fórmula 1) del compuesto representado por la fórmula de la presente invención, como mediador.

El compuesto marcado de la presente invención contiene un enlazador que no se hidroliza por la proteasa en suero *in vivo*, de modo que muestra una excelente estabilidad en suero humano, lo que indica que el compuesto se puede usar eficazmente como un compuesto marcado (ver Ejemplo Experimental 1).

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para tratar o diagnosticar cáncer de próstata que comprende el compuesto marcado anterior como un ingrediente activo. Además, la presente invención proporciona un radiofármaco para la obtención de imágenes del cáncer de próstata que comprende el compuesto marcado anterior como un ingrediente activo.

En este momento, los radioisótopos son principalmente radionúclidos emisores de rayos alfa, radionúclidos emisores de rayos beta, radionúclidos emisores de rayos gamma y radionúclidos emisores de rayos de positrones, etc. Entre ellos, radionúclidos emisores de rayos alfa y beta Los radionúclidos emisores de rayos se utilizan para el tratamiento y los radionúclidos emisores de rayos gamma y los radionúclidos emisores de rayos de positrones se utilizan para el diagnóstico mediante imagenología de núcleo.

Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se usa para la obtención de imágenes del cáncer de próstata, el radioisótopo del compuesto marcado es preferentemente ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{111}In . Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se usa para tratar el cáncer de próstata, el radioisótopo es preferentemente ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{177}Lu o $^{117\text{m}}\text{Sn}$.

5

Entre los radioisótopos, Ga-68 es un conocido radionúclido emisor de haz de positrones, que tiene una vida media tan corta como 68 minutos. Por lo tanto, es útil para PET y, en particular, tiene un gran potencial para uso futuro debido a una ventaja económica debido al desarrollo de un generador. Ga-68 está marcado principalmente con DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético) o NOTA (ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético) como agente quelante bifuncional.

10

El DOTA se usa ampliamente para el marcado de radioisótopos tales como In-111, Y-90, Lu-177 y Ga-68. NOTA se usa para marcar In-111 y Ga-67 con T101, un anticuerpo monoclonal, que es inestable con In-111, pero está marcado de manera estable con Ga-67 (Lee J, et al. Nucl Med Biol 1997;24:225-30).

15

La composición farmacéutica de la presente invención es excelente en cuanto a estabilidad en suero humano cuando se administra *in vivo* y no solo es excelente en cuanto a la unión a PSMA expresada competitivamente en cáncer de próstata sino también excelente en cuanto a la supresión de PSMA en una concentración baja. La composición se excreta en el riñón en lugar de en la vía biliar debido a su alta solubilidad en agua. Por lo tanto, la composición se puede absorber en los tejidos del cáncer de próstata y emite radiación a la región del cáncer de próstata. Por lo tanto, la composición de la invención puede usarse eficazmente como una composición farmacéutica para tratar y diagnosticar el cáncer de próstata.

20

Además, la presente invención proporciona un kit para tratar o diagnosticar cáncer de próstata que comprende el compuesto representado por la fórmula 1 anterior o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo y se marca con un radioisótopo metálico farmacéuticamente aceptable en una forma esterilizada no pirogénica.

25

En particular, el kit para tratar o diagnosticar el cáncer de próstata de la presente invención contiene el compuesto representado por la fórmula 1 en la concentración de 10 ng ~ 100 mg.

30

El kit para tratar o diagnosticar el cáncer de próstata de la presente invención comprende el vial esterilizado que contiene el compuesto representado por la fórmula 1 en un tampón apropiado para que el compuesto representado por la fórmula 1 sea fácilmente marcado con un radioisótopo metálico que se almacena como se sella en un refrigerador, un congelador o se liofiliza, y luego se usa según sea necesario.

35

En este momento, para regular el pH en el curso del marcado por radioisótopos, se le agregaron 0,01 ml ~ 10 ml de un tampón (pH 1~9, conc. 1 μM ~10 M), que se puede sellar en el estado disuelto, el estado congelado o el estado liofilizado.

40

El tampón de la presente invención es preferentemente ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido ascórbico, ácido butírico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido carbónico, ácido glucoheptónico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glucárico, ácido bórico y sus sales de sodio o sales de potasio.

45

Además, el kit de la presente invención puede contener adicionalmente un antioxidante. El antioxidante se utiliza para prevenir la degradación del compuesto representado por la fórmula 1 marcado con un radioisótopo causado por la descomposición de la radiación, que se ejemplifica preferentemente por la vitamina C o el ácido gentísico. El antioxidante está contenido preferentemente en el kit de la presente invención en una cantidad de 0 ~ 500 mg por dosis unitaria.

50

El kit se puede complementar con viales de esterilización con tampón, solución salina, jeringas, filtros, columnas y otros equipos auxiliares para producir medicamentos inyectables para uso de tecnólogos o técnicos médicos. Es bien conocido por los expertos en la técnica que tienen conocimientos generales sobre este campo que el kit puede variarse o modificarse de acuerdo con la necesidad personal o la dieta de un paciente y también puede cambiarse de la manera en que se proporciona el radioisótopo o adquirido.

55

El kit anterior puede proporcionar un compuesto marcado con radioisótopos agregando un radioisótopo al compuesto representado por la fórmula 1 en la concentración de 0,1 ~ 500 o 1 ~ 500 mCi por 1 mg del compuesto, seguido de una reacción para 0,1 ~ 30 minutos antes de su uso.

60

Las realizaciones prácticas y actualmente preferentes de la presente invención son ilustrativas como se muestra en los siguientes Ejemplos.

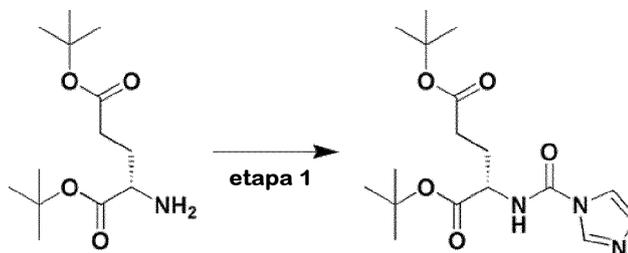
Sin embargo, se apreciará que los expertos en la técnica, considerando esta descripción, pueden realizar modificaciones y mejoras dentro del espíritu y ámbito de la presente invención.

65

Ejemplo 1: Preparación de ácido (S)-2-(3-((S)-1-carboxi-5-(3-(4-((1,4,7-tris(carboximetil)-1,4,7-triazonano-2-il)metil)fenil)tioureido)pentil)ureido)pentanodioico (GUL-SCN-NOTA)Etapa 1: Preparación de (S)-di-terc-butil 2-(1H-imidazol-1-carboxamido)pentanedioato

5

10



15

20

Se disolvió clorhidrato de L-di-terc-butil glutamato (1,50 g, 5,1 mmoles) en diclorometano (15 ml) y luego se enfrió a 0°C, a lo que se añadió trietilamina (1,74 ml, 12,5 mmoles) y 4-(dimetilamino)piridina. La mezcla se agitó durante 5 minutos, luego se le añadió 1,1'-carbonildiimidazol (981 mg, 6,05 mmol). La temperatura de la mezcla se elevó a temperatura ambiente, seguido de agitación durante 18 horas. Se añadieron 30 ml de diclorometano para la dilución. La mezcla se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio (10 ml), agua (2 x 10 ml) y salmuera (10 ml). Luego, la capa orgánica se deshidrató con sulfato de sodio. La mezcla se filtró y el filtrado se secó a presión reducida, seguido del tratamiento de solución de hexano/acetato de etilo. Como resultado, se obtuvo un material sólido blanco. El material sólido blanco obtenido se lavó con hexano (50 ml) y el material sólido blanco final se analizó mediante análisis instrumental.

25

Rendimiento: 1,44 g, 80%;

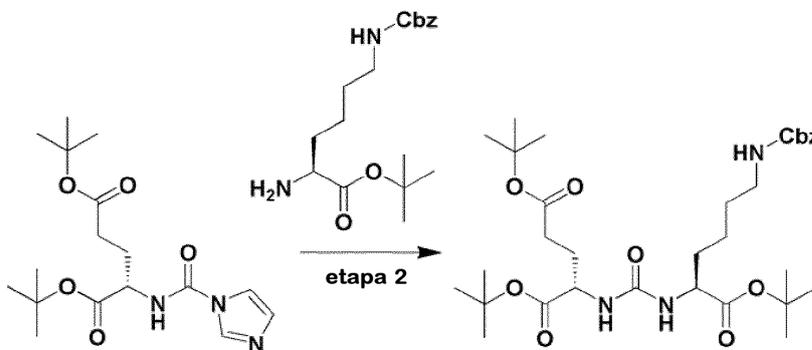
 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 8,29 (s, 1H), 7,73 (s, 1H), 7,05 (s, 1H), 7,01 (s, 1H), 4,24 (m, 1H), 2,36 (t, J = 7,26 Hz, 2H), 2,03 (m, 1H), 1,87 (m, 1H), 1,42 (s, 9H), 1,39 (s, 9H).
Espectro de masas (ESI⁺), m/z = 354 [M+H]⁺.

30

Etapa 2: Preparación de (9S, 13S)-tri-terc-butilo 3,11-dioxo-1-fenil-2-oxa-4,10,12-triazapentadecan-9, 13, 15-tricarboxilato

35

40



45

50

(S)-di-terc-butil 2-(1H-imidazol-1-carboxamido)pentanedioato (780 mg, 2,208 mmol) preparado en la etapa 1 se disolvió en diclorometano (7,8 ml) y luego se enfrió a 0°C, a la que se añadieron trietilamina (0,615 ml, 4,417 mmol) y trifluorometanosulfonato de metilo (MeOTf) (0,252 ml, 2,230 mmol). La temperatura de la mezcla se elevó a temperatura ambiente mientras se agitaba, seguido de agitación adicional durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se añadió con (S)-terc-butil-2-amino-6-((benciloxi)carbonil)amino)hexanoato (743 mg, 2,208 mmol) y se calentó a 40°C, seguido de agitación durante la noche. Una vez completada la reacción, la solución se secó a presión reducida. Luego, se obtuvo un producto sólido utilizando éter y hexano.

55

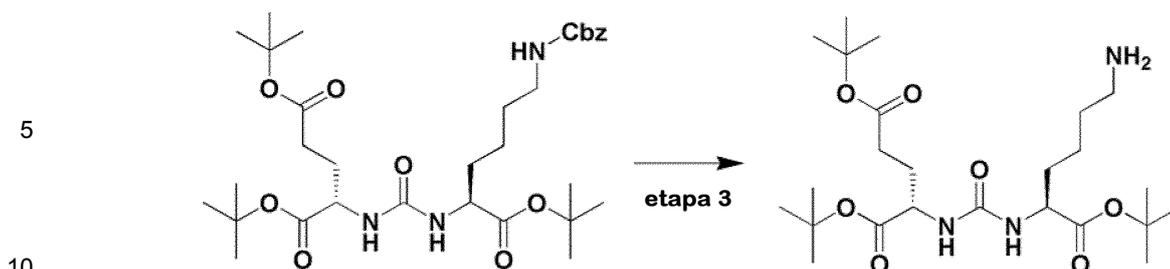
Rendimiento: 1,18 g, 86%;

Espectro de masas (ESI⁺), m/z = 622 [M+H]⁺.

60

Etapa 3: Preparación de (S)-di-terc-butil 2-(3-((S)-6-amino-1-terc-butoxi-1-oxohexan-2-il)ureido)pentanedioato

65



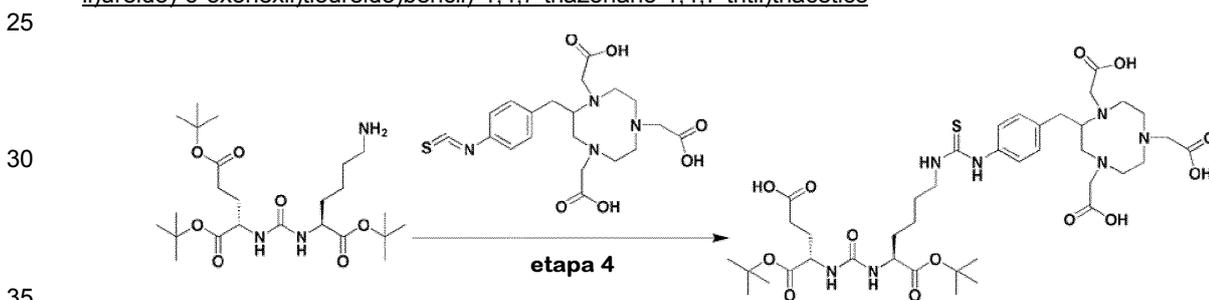
15 Se añadieron formiato de amonio (314 mg, 4,986 mmol) y 10% en peso de paladio carbono (100 mg) a la solución de etanol (5 ml) de (9S, 13S)-tri-terc-butilo 3,11-dioxo-1-fenil-2-oxa-4,10,12-triazapentadecan-9, 13, 15-tricarboxilato (310 mg, 0,499 mmol) preparado en la etapa 2, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. Una vez completada la reacción, la mezcla se filtró usando Celite 545 y luego se lavó con acetato de etilo (25 ml x 3). Se obtuvo un producto sólido blanco destilando el filtrado a presión reducida.

Rendimiento: 243 mg, 98%.

20 ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ 8,43 (s, 1H), 8,10-7,10 (br, 1H), 6,50 (m, 2H), 4,01 (m, 1H), 3,92 (m, 1H), 2,69 (m, 2H), 2,17 (m, 2H), 1,83 (m, 1H), 1,70-1,49 (m, 4H), 1,38 (m, 27H), 1,29 (m, 2H).

Espectro de masas (ESI⁺), *m/z* = 488 [M+H]⁺.

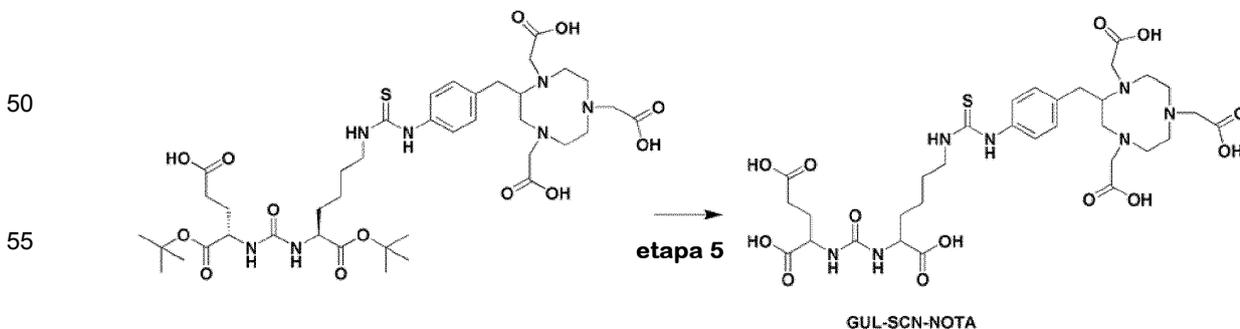
25 Etapa 4: Preparación de ácido 2,2',2''-(2-(4-(3-((S)-6-(terc-butoxi)-5-(3-((S)-1,5-di-terc-butoxi-1,5-dioxopentano-2-il)ureido)-6-oxohexil)tioureido)encil)-1,4,7-triazonano-1,4,7-tritil)triacético



40 (S)-di-terc-butil 2-(3-((S)-6-amino-1-terc-butoxi-1-oxohexan-2-il)ureido)pentanedioato (47,8 mg, 0,0982 mmol), ácido 2,2',2''-(2-(4-isotiocianatobencil)-1,4,7-triazonano-1,4,7-tritil)triacético (SCN-Bz-NOTA, 55 mg, 0,0982 mmol), y trimetilamina (0,068 ml, 0,491 mmol) preparados en la etapa 3 se disolvieron en cloroformo (1,0 ml), seguido de agitación a temperatura ambiente durante la noche. Una vez completada la reacción, el solvente se secó a presión reducida. Un producto fue confirmado por LC/MC.

Espectro de masas (ESI⁺), *m/z* = 939 [M+H]⁺.

45 Etapa 5: Preparación de ácido (S)-2-(3-((S)-1-carboxi-5-(3-(4-((1,4,7-tris(carboximetil)-1,4,7-triazonano-2-il)metil)fenil)tioureido)pentil)ureido)pentanedioico



60 El ácido 2,2',2''-(2-(4-(3-((S)-6-(terc-butoxi)-5-(3-((S)-1,5-di-terc-butoxi-1,5-dioxopentano-2-il)ureido)-6-oxohexil)tioureido)encil)-1,4,7-triazonano-1,4,7-tritil)triacético preparado en la etapa 4 se disolvió en ácido trifluoroacético/diclorometano (v/v 1/1, 2,0 ml), seguido de agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla se secó a presión reducida, seguido de purificación por HPLC usando MeCN y agua destilada para dar GUL-NOTA.

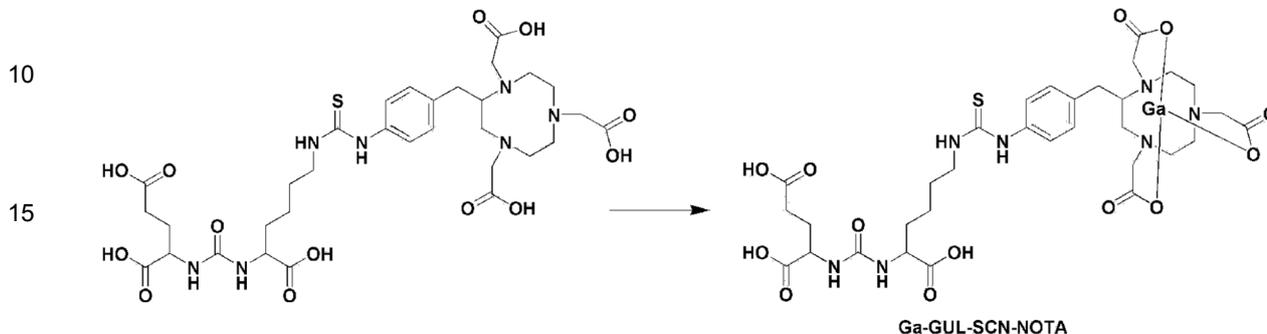
65 Rendimiento: 47,8 mg, 63% (rendimiento global en 2 etapas).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 12,4 (br, 6H), 9,45 (s, 1H), 7,69 (s, 1H), 7,38 (d, $J = 8,10$ Hz, 2H), 7,18 (d, $J = 8,16$ Hz, 2H), 6,76 ~ 6,41 (br, 2H), 6,30 (m, 2H), 4,12-2,61 (m, 22H), 2,19 (m, 2H), 1,86 (m, 1H), 1,74-1,51 (m, 4H), 1,29 (m, 2H).

Espectro de masas (ESI $^+$), $m/z = 770$ [M+H] $^+$.

5

Ejemplo 2: Preparación de Ga-NOTA-SCN-GUL



10

15

20

25

30

35

El GUL-NOTA (47,8 mg, 0,0621 mmol) preparado en el Ejemplo 1 se disolvió en un tampón de NaOAc 1,0 M (2,0 ml, pH de 5,6) junto con GaCl $_3$ 0,5 M (1,242 ml, 0,621 mmol) disuelto en pentano, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 8 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 μm y el filtrado se separó por cromatografía en columna de gel de sílice (acetato de etilo: n-hexano = 1:1, v/v). Como resultado, se obtuvo un compuesto sólido blanco.

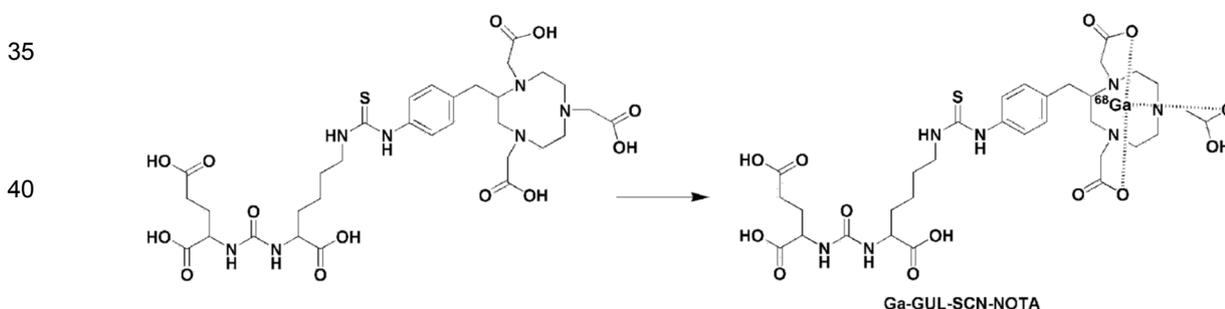
Rendimiento: 268 mg, 58%.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 12,4 (br, 3H), 9,45 (s, 1H), 7,69 (s, 1H), 7,38 (d, $J = 8,10$ Hz, 2H), 7,18 (d, $J = 8,16$ Hz, 2H), 6,76 ~ 6,41 (br, 2H), 6,30 (m, 2H), 4,12-2,61 (m, 22H), 2,19 (m, 2H), 1,89 (m, 1H), 1,74-1,51 (m, 4H), 1,29 (m, 2H).

30

Espectro de masas (ESI $^+$), $m/z = 837$ [M+H] $^+$.

Ejemplo 3: Preparación de Ga-68-NOTA-SCN-GUL



45

50

55

Se disolvió Ga-68-Cl $_3$ (200 μl , 111 MBq) en HCl 0,1 M, que se añadió a un tampón de acetato de sodio 1 M (pH = 5,6, 200 μl). Se añadió una solución de MeCN que contenía GUL-NOTA (10 μl , 1 mg/ml) preparado en el Ejemplo 1, que se agitó vigorosamente durante 1 minuto, seguido de reacción a temperatura ambiente durante 10 minutos. La eficiencia de marcado se calculó realizando ITLC-SG utilizando Na $_2$ CO $_3$ 0,1 M como solvente de desarrollo. En este momento, el Ga-68-NOTA-SCN-GUL marcado se movió a la parte superior ($R_f=1,0$) (Figura 1a) y el Ga-68 no marcado permaneció en el origen ($R_f=0,0$) (Figura 1b). Como resultado, la eficiencia de marcado fue más del 99%.

60

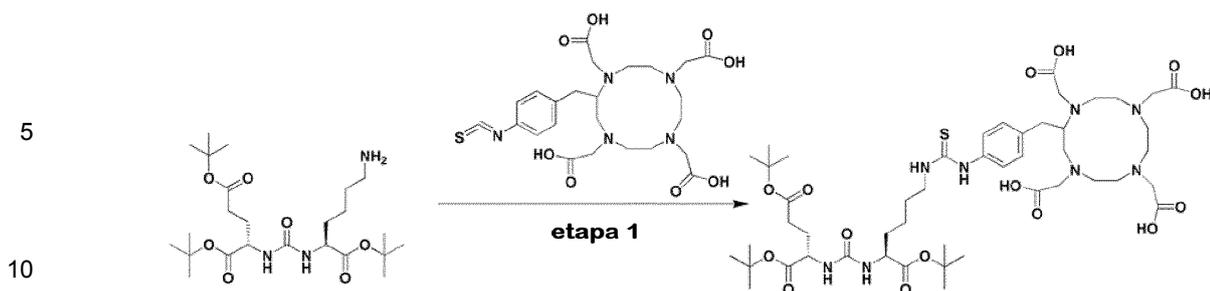
Ejemplo 4: Preparación de ácido (S)-2-(3-((S)-1-carboxi-5-(3-(4-((1,4,7,10-tetrakis(carboximetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-2-il)metil)fenil)tioureido)pentil)ureido)pentanodioico (GUL-SCN-DOTA)

55

Etapa 1: Preparación de ácido 2,2',2''-(2-(4-(3-((S)-6-(terc-butoxi)-5-(3-((S)-1,5-di-terc-butoxi-1,5-dioxopentano-2-il)ureido)-6-oxohexil)tioureido)benzil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetriil)tetraacético

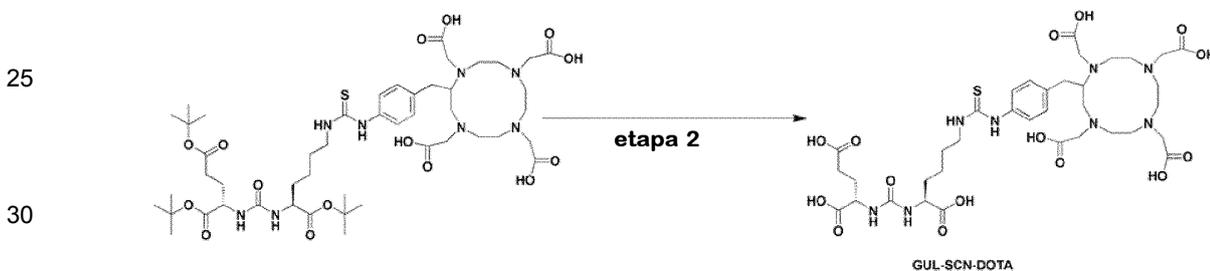
60

65



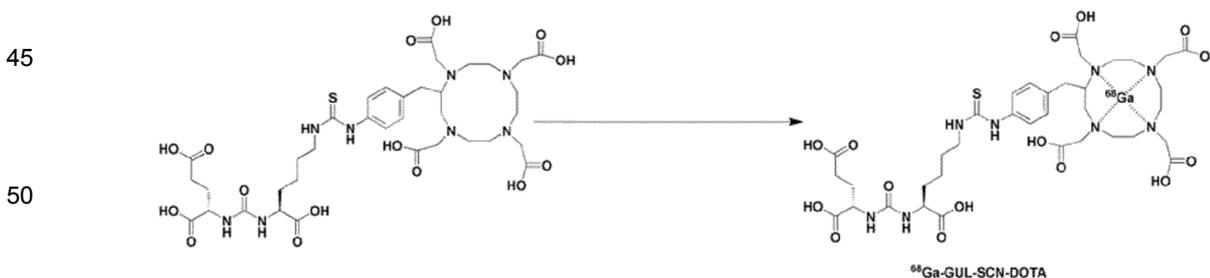
15 (S)-di-terc-butil 2-(3-((S)-6-amino-1-terc-butoxi-1-oxohexan-2-il)ureido)pentanedioato (30 mg, 0,0615 mmol) preparado en la etapa 3 del Ejemplo 1, ácido 2,2',2"-2-(4-isotiocianatobencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (SCN-Bz-DOTA, 50 mg, 0,0727 mmol) y trimetilamina (0,043 ml, 0,308 mmol) se disolvieron en cloroformo (1,0 ml), seguido de agitación a temperatura ambiente. El solvente se secó a presión reducida y el peso molecular del producto final se calculó por LC/MS. Espectro de masas (ESI⁺), $m/z = 1040$ [M+H]⁺ observado.

20 Etapa 2: Preparación de ácido (S)-2-(3-((S)-1-carboxi-5-(3-(4-((1,4,7,10-tetrakis(carboximetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-2-il)metil)fenil)tioureido)pentil)ureido)pentanodioico



35 El ácido 2,2',2"-2-(4-(3-((S)-6-(terc-butoxi)-5-(3-((S)-1,5-di-terc-butoxi-1,5-dioxopentano-2-il)ureido)-6-oxohexil)tioureido)bencil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético preparado en la etapa 1 se disolvió en 2,0 ml de solución de TFA/DCM (v/v: 1/1), seguido de agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se secó a presión reducida. El producto se lavó con DC que contiene 10% de MeOH y, como resultado, se obtuvo GUL-DOTA como un polvo blanco con un rendimiento del 43%. El peso molecular del producto se calculó por LC/MS. Espectro de masas (ESI⁺), $m/z = 871$ [M+H]⁺ observado.

Ejemplo 5: Preparación de Ga-68-DOTA-SCN-GUL



55 Se le añadió una solución de MeCN que contenía GUL-DOTA (10 μ l, 1 mg/ml) preparado en el Ejemplo 4, que se agitó vigorosamente durante 1 minuto, seguido de reacción a 95°C durante 10 minutos. La eficiencia de marcado se calculó realizando ITLC-SG utilizando Na₂CO₃ 0,1 M como solvente de desarrollo. En este momento, el Ga-68-DOTA-SCN-GUL marcado se movió a la parte superior (Rf=1,0) (Figura 2a) y el Ga-68 no marcado permaneció en el origen (Rf=0,0) (Figura 2b). Como resultado, la eficiencia de marcado fue más del 95%.

Ejemplo Experimental 1: Prueba de estabilidad en suero humano

60 La estabilidad en suero humano se examinó probando la estabilidad del compuesto cuando se puso en contacto con suero humano. La estabilidad *in vivo* se probó *in vitro*.

65

1. Ga-68-NOTA-SCN-GUL

Con el fin de investigar la estabilidad de Ga-68-NOTA-SCN-GUL de la presente invención en suero humano, se añadieron 3,7 MBq (100 μ l) de Ga-68-NOTA-SCN-GUL preparado en el Ejemplo 3 a 1 ml de suero humano, que se mezcló bien, seguido de cultivo por agitación a 36,5°C. Dos horas más tarde, la mezcla de reacción se analizó mediante ITLC.

Como resultado, se confirmó que la mayor parte de Ga-68-NOTA-SCN-GUL existía como tal y sin descender a Ga-68 (Figura 1c).

2. Ga-68-DOA-SCN-GUL

Con el fin investigar la estabilidad de Ga-68-DOA-SCN-GUL de la presente invención en suero humano, se añadieron 3,7 MBq (100 μ l) de Ga-68-DOA-SCN-GUL preparado en el Ejemplo 5 a 1 ml de suero humano, que se mezcló bien, seguido de cultivo por agitación a 36,5°C. Dos horas más tarde, la mezcla de reacción se analizó mediante ITLC.

Como resultado, se confirmó que la mayor parte del Ga-68-DOA-SCN-GUL existía como tal, y solo el 9% de Ga-68-DOA-SCN-GUL descendió a Ga-68 (Figura 2c).

Por lo tanto, Ga-68-NOTA-SCN-GUL o Ga-68-DOA-SCN-GUL de la presente invención contiene un enlace tiourea que no se hidroliza por la proteasa en suero y no incluye el enlace amida, de modo que tiene una excelente estabilidad en suero humano a medida que se pueda obtener una imagen clara.

Ejemplo experimental 2: ensayo de unión a células por inhibición competitiva *in vitro*

Para realizar la prueba de unión a células por inhibición competitiva *in vitro* de Ga-NOTA-SCN-GUL, se realizó el siguiente experimento.

La línea celular de cáncer de próstata positiva a PSMA 22Rv1 se cargó en una placa de 24 pocillos a la densidad de 2×10^5 células/pocillo, seguido de cultivo en una incubadora de CO₂ al 5% a 37°C durante 24 horas. Ga-NOTA-SCN-GUL preparado en el Ejemplo 2 se diluyó dos veces en serie con el medio de cultivo celular que contenía un 0,5% de albúmina de suero bovino. La muestra diluida se añadió a las células cultivadas (0,5 ml/pocillo), a las que se añadió 1,85 kBq de ácido (S)-2-(3-((S)-1-carboxi-5-((4-yodobencil)amino)pentilo)ureido)pentanodioico (I-125-MIP-1072) (0,5 ml/pocillo). Después de mezclar bien, la mezcla se cultivó en una incubadora de CO₂ al 5% a 37°C durante 1 hora. El medio de cultivo se descartó y las células se lavaron con medio fresco dos veces, a lo que se añadió dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,5% disuelto en PBS (1 ml/pocillo). La mezcla se agitó suavemente para completar la disolución y luego se cargó en un tubo de ensayo de plástico desechable de 5 ml. Luego, se midió la radioactividad con un contador gamma.

Como resultado, a medida que aumentaba la concentración de Ga-NOTA-SCN-GUL de la presente invención, disminuía la unión entre I-125-MIP-1072 y las células de cáncer de próstata (Figura 3a). El valor de IC₅₀ se calculó como 18,3 nM por análisis de regresión no lineal (Figura 3b).

Por lo tanto, se confirmó que Ga-NOTA-SCN-GUL de la presente invención no solo era excelente en la unión competitiva a las células de cáncer de próstata, sino que también era excelente para suprimir las células de cáncer de próstata a una concentración baja.

Ejemplo experimental 3: imágenes de PET de animales experimentales implantados con cáncer

Se administró Ga-68-NOTA-SCN-GUL de la presente invención al animal trasplantado con cáncer de próstata, seguido de imágenes de PET para investigar la selección del tejido canceroso de la siguiente manera.

En particular, se inyectaron subcutáneamente 0,1 ml de RPMI1640 que contenían 5×10^6 células de 22Rv1 células en el lado lateral izquierdo del ratón macho BALB/c desnudo de 4 semanas de edad. Después de 2 ~ 3 semanas, se confirmó que el tejido tumoral tenía un tamaño apropiado y se usó para el experimento. Ga-68-NOTA-SCN-GUL se diluyó en solución salina inyectable, dando como resultado 10,2 MBq/100 μ l de solución para inyección animal. La solución preparada se inyectó en la vena de la cola del ratón trasplantado con células cancerosas. Una hora más tarde, se realizó una imagen PET con el animal durante 10 minutos.

Como resultado, el Ga-68-NOTA-SCN-GUL de la presente invención se excreta en el riñón y se absorbe en tejidos de cáncer de próstata (Figura 4a). Estas imágenes de excreción de riñón se observaron normalmente en las imágenes de PET de los péptidos pequeños marcados con isótopos, lo que indica que era posible obtener imágenes del cáncer de próstata.

En el caso de que se inyectara MIP-1072 que podía unirse a PSMA antes de la administración de Ga-68-NOTA-SCN-GUL, Ga-68-NOTA-SCN-GUL no se absorbió en los tejidos con cáncer de próstata (Figura 4b). Este resultado respaldó que las imágenes de cáncer de próstata podrían obtenerse mediante la unión específica entre Ga-68-NOTA-SCN-GUL y PSMA.

Por lo tanto, se confirmó que Ga-68-NOTA-SCN-GUL de la presente invención puede unirse específicamente a PSMA y, por lo tanto, puede usarse de manera efectiva para obtener imágenes del cáncer de próstata.

Ejemplo experimental 4: prueba de distribución *in vivo* de un animal experimental implantado con cáncer

Se administró Ga-68-NOTA-SCN-GUL o Ga-68-DOTA-SCN-GUL de la presente invención al animal trasplantado con cáncer de próstata, seguido de una distribución *in vivo* para investigar si el tejido canceroso era o no realmente observado en el mismo.

En particular, se inyectaron subcutáneamente 0,1 ml de RPMI1640 que contenían 5×10^6 células de 22Rv1 células en el lado lateral izquierdo del ratón macho BALB/c desnudo de 4 semanas de edad. Después de 2 ~ 3 semanas, se confirmó que el tejido tumoral tenía un tamaño apropiado y se usó para el experimento. Ga-68-NOTA-SCN-GUL preparado en el Ejemplo 3 o Ga-68-DOTA-SCN-GUL preparado en el Ejemplo 5 se diluyó en solución salina inyectable, dando como resultado 0,74 MBq/100 μ l de solución para inyección animal. La solución preparada se inyectó en la vena de la cola del ratón trasplantado con células cancerosas. Una hora más tarde, se extrajeron los tumores, la sangre, los músculos, el corazón, los pulmones, el hígado, el bazo, el estómago, el intestino delgado, los riñones y los huesos, y se midieron su peso y radioactividad. Con base en estos datos, se calculó la absorción por unidad de tejido para la dosis (% ID/g) y los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Órgano	Ejemplo 3 ^{68}Ga -GUL-SCN-NOTA	Ejemplo 5 ^{68}Ga -GUL-SCN-DOTA
Sangre	0,17 \pm 0,12	0,29 \pm 0,08
Músculo	0,04 \pm 0,02	0,15 \pm 0,07
Tumor	5,40 \pm 0,35	4,66 \pm 0,63
Corazón	0,08 \pm 0,04	0,26 \pm 0,07
Pulmón	0,31 \pm 0,21	0,77 \pm 0,17
Hígado	0,19 \pm 0,03	0,27 \pm 0,07
Estómago	1,38 \pm 0,63	4,80 \pm 0,67
Bazo	0,10 \pm 0,02	0,41 \pm 0,12
Intestino	0,20 \pm 0,06	0,17 \pm 0,03
Riñón	56,12 \pm 15,08	165,11 \pm 8,63
Hueso	0,69 \pm 0,20	2,20 \pm 0,47

(En la tabla 2, los datos representan la media \pm % desviación estándar ID/g (n = 4)).

Como se muestra en la Tabla 2, Ga-68-NOTA-SCN-GUL o Ga-68-DOTA-SCN-GUL de la presente invención se absorbió altamente en el riñón, por lo que la absorción en el riñón fue tan alta como o incluso más alta que los radiofármacos convencionales para la obtención de imágenes de péptidos. La absorción fue la más alta en tejidos cancerosos. La absorción de Ga-68-DOTA-SCN-GUL en el bazo fue un poco mayor que en el tejido canceroso, que, sin embargo, no resulta estadísticamente significativo.

Por lo tanto, se confirmó que Ga-68-NOTA-SCN-GUL o Ga-68-DOTA-SCN-GUL de la presente invención se pueden usar de manera efectiva como un producto farmacéutico radioactivo ya que fueron eficientes en cuanto a la obtención de imágenes del cáncer de próstata.

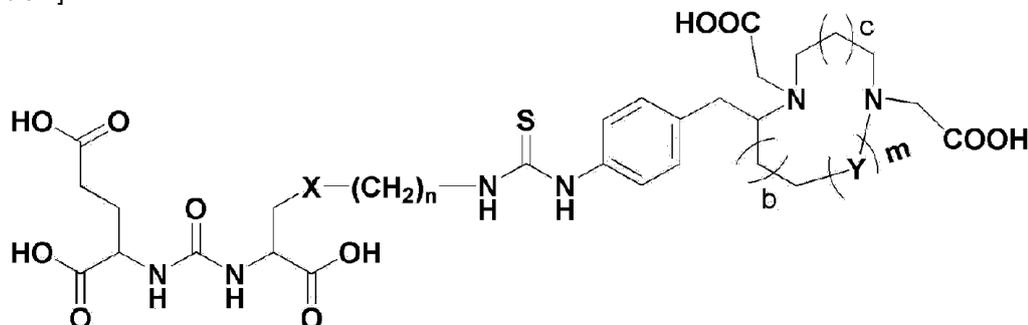
Aplicabilidad industrial

La presente invención se refiere a un derivado peptídico de tiourea, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un compuesto marcado con radioisótopos que comprende el mismo y una composición farmacéutica para tratar o diagnosticar el cáncer de próstata que comprende el mismo como un ingrediente activo. El derivado peptídico de tiourea de la presente invención es excelente en cuanto a estabilidad en suero humano cuando se administra *in vivo* y no solo se une bien a PSMA expresado en cáncer de próstata, sino que también inhibe excelentemente a PSMA en una concentración baja. Además, el derivado de la invención tiene una alta solubilidad en agua y se puede excretar en el riñón y no en la vía biliar, de modo que se pueda obtener una imagen clara de la región tumoral del cáncer de próstata. Por lo tanto, el derivado de la presente invención se puede usar eficazmente como una composición farmacéutica para tratar y diagnosticar el cáncer de próstata.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la fórmula 1 a continuación o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

[Fórmula 1]



(En la fórmula 1:

X es enlace simple, -O- o -S-;

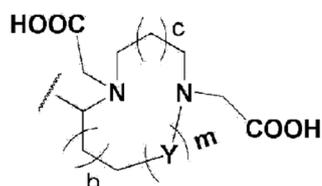
n es un número entero de 1 ~ 5;

Y es -N(CH₂COOH)(CH₂)_aCH₂CH₂-;

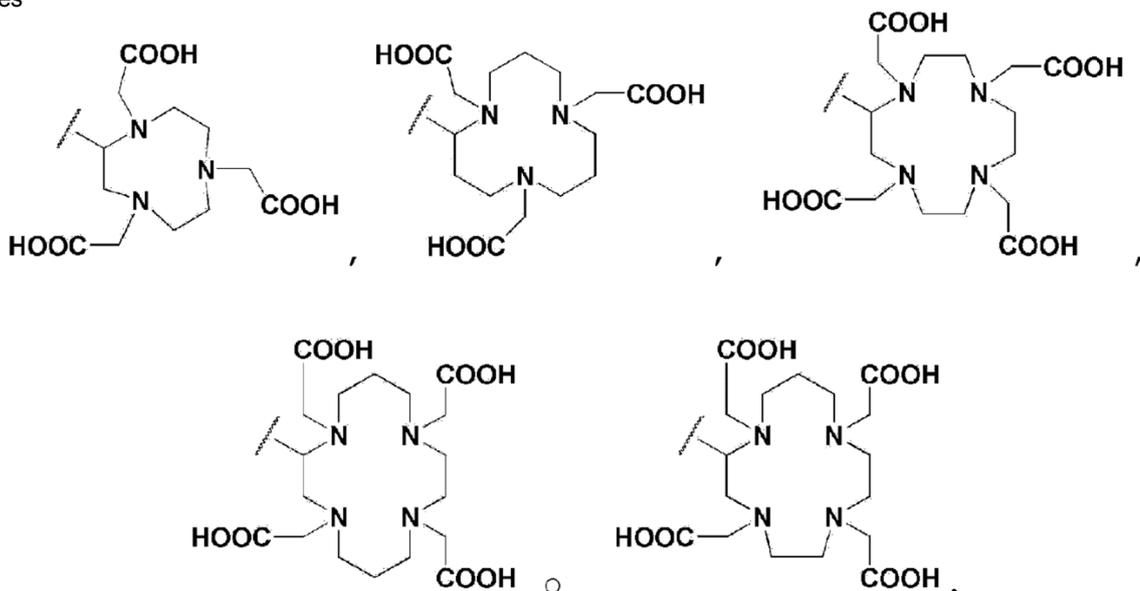
m es un número entero de 1 o 2; y

a, b y c son independientemente un número entero de 0 o 1).

2. El compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que X es un enlace simple; n es 3; y

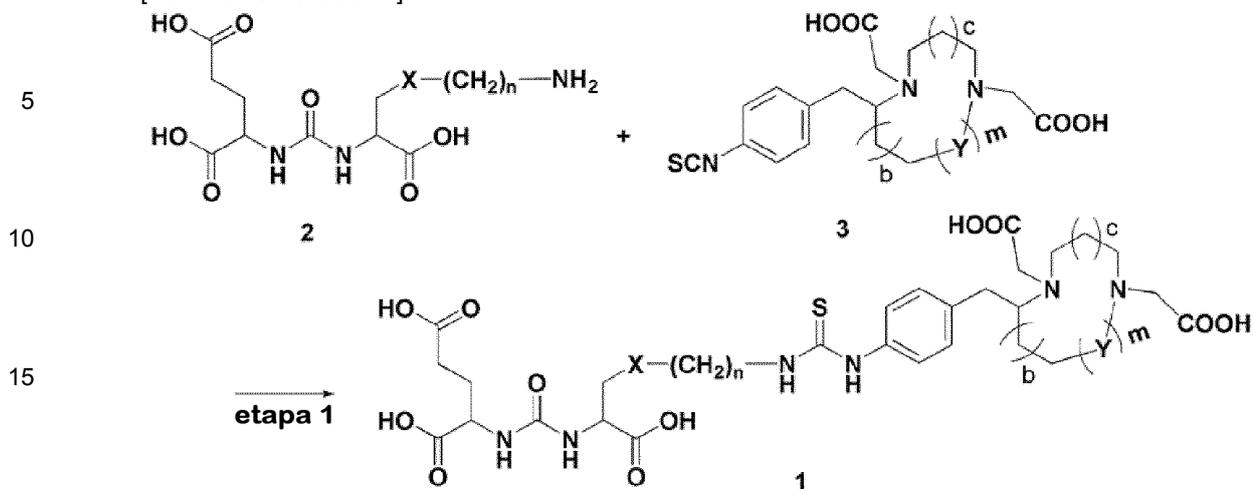


es



3. Un procedimiento de preparación del compuesto representado por la fórmula 1 que comprende la etapa de preparar el compuesto representado por la fórmula 1 haciendo reaccionar el compuesto representado por la fórmula 2 y el compuesto representado por la fórmula 3 (etapa 1), como se muestra en la fórmula de reacción 1 a continuación:

[Fórmula de Reacción 1]



(En la fórmula de reacción 1, X, n, Y, m, a, b y c son como se definen en la fórmula 1).

- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
4. Un compuesto marcado preparado mediante la coordinación de un radioisótopo metálico con el compuesto representado por la fórmula 1 de la reivindicación 1 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
 5. El compuesto marcado de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el radioisótopo metálico es ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ¹¹¹In, ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu, o ^{117m}Sn.
 6. Composición que comprende el compuesto marcado de acuerdo con la reivindicación 4, para su uso en el tratamiento o el diagnóstico de cáncer de próstata.
 7. Composición que comprende el compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o su sal farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento o el diagnóstico de cáncer de próstata.
 8. Un kit para su uso en el tratamiento o diagnóstico de cáncer de próstata que comprende el compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o su sal farmacéuticamente aceptable.
 9. El kit para su uso en el tratamiento o diagnóstico de cáncer de próstata de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el kit contiene un tampón que tiene un pH de 1 a 9 y una concentración de 1 μM a 10 M.
 10. El kit para su uso en el tratamiento o diagnóstico de cáncer de próstata de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el tampón es ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido ascórbico, ácido butírico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido carbónico, ácido glucoheptónico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glucárico, ácido bórico o sus sales de sodio o sales de potasio.

Figura 1a

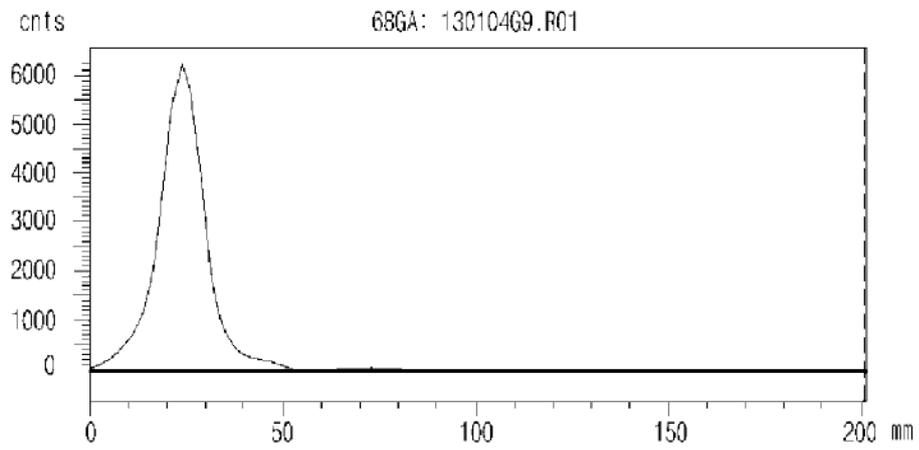


Figura 1b

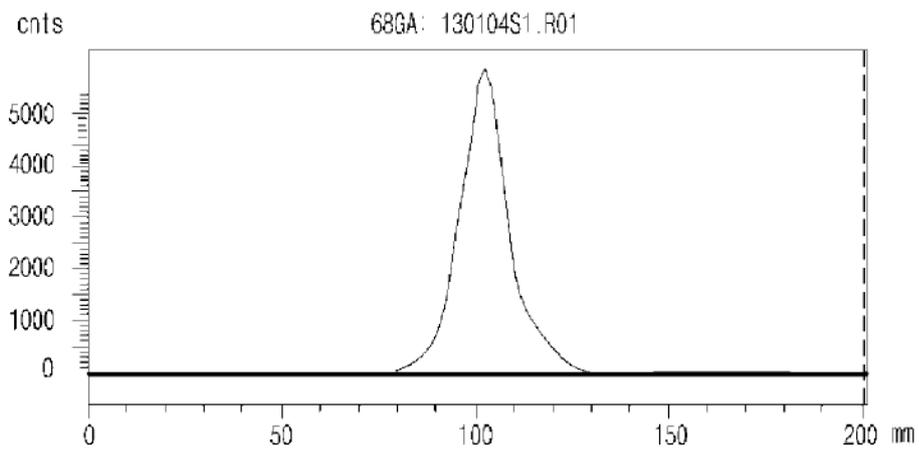


Figura 1c

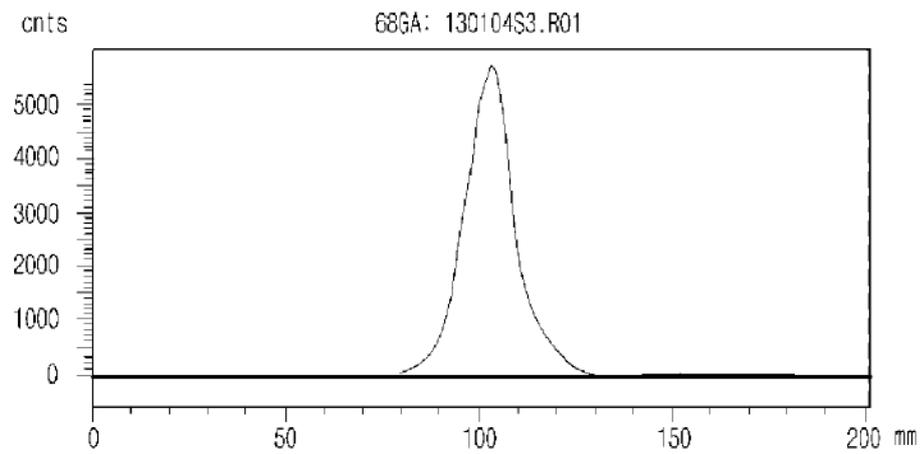


Figura 2a

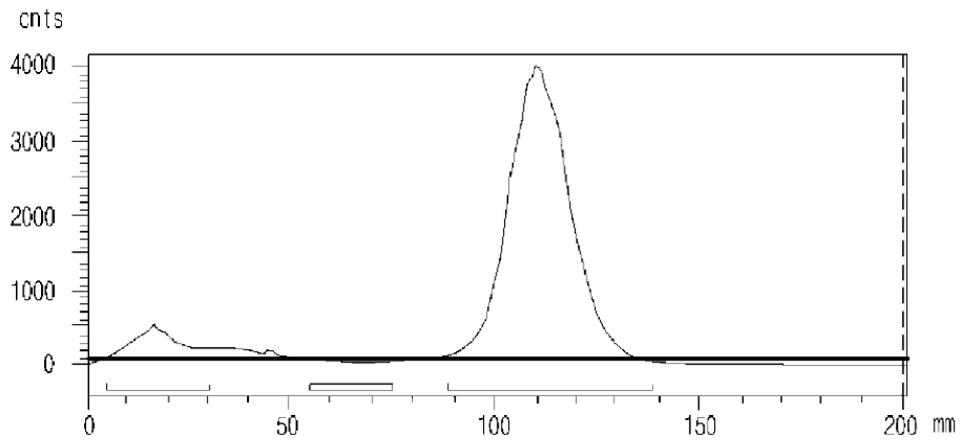


Figura 2b

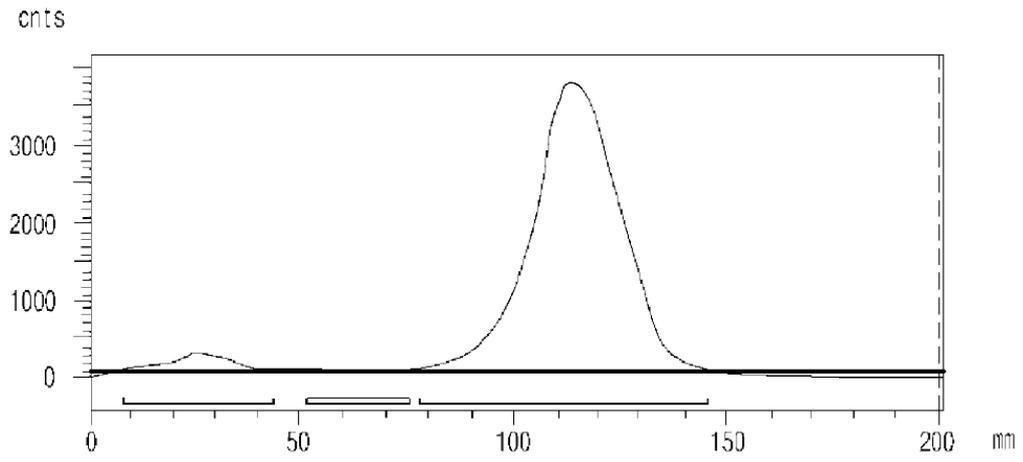


Figura 2c

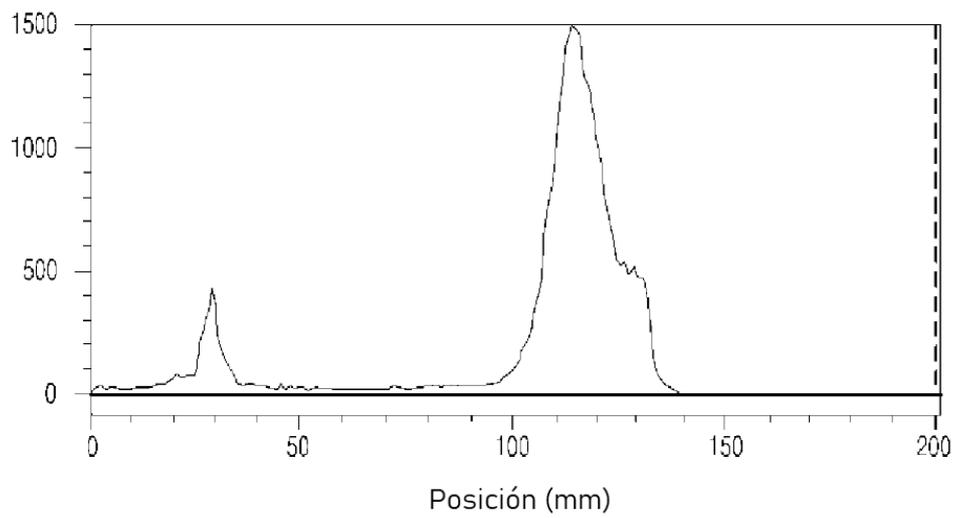


Figura 3a

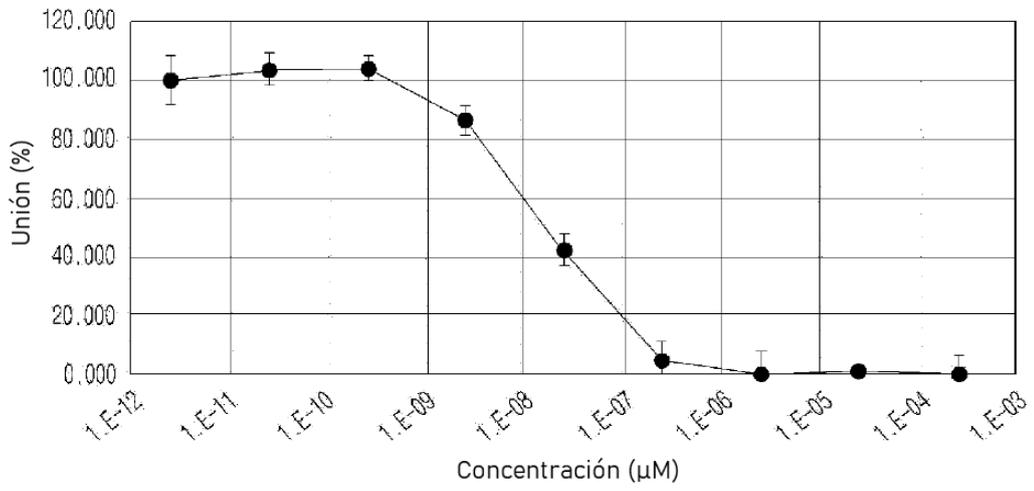


Figura 3b

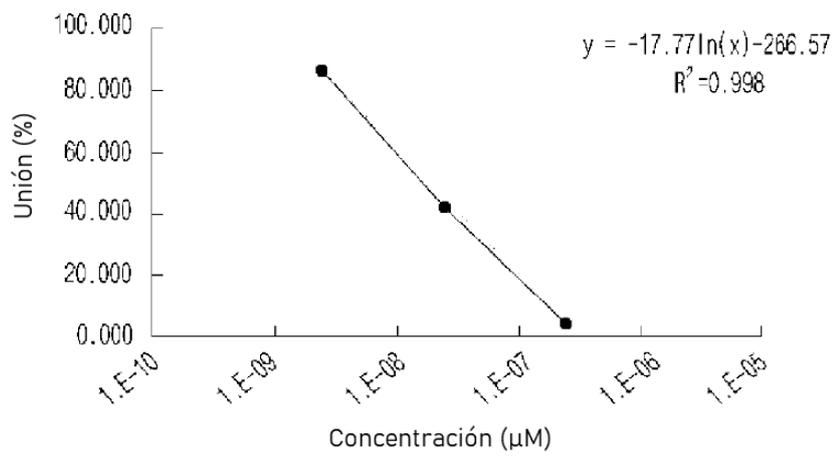


Figura 4a

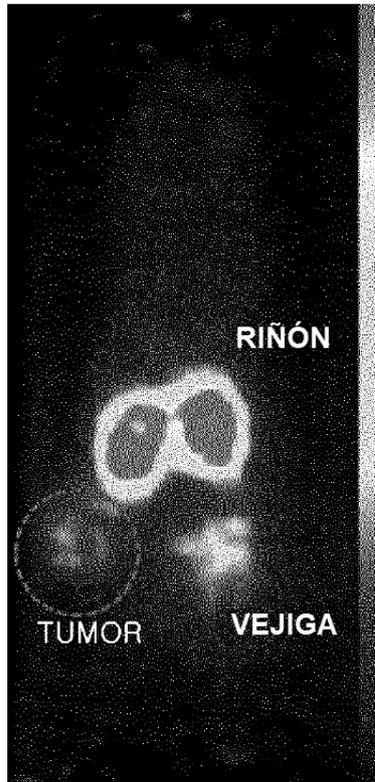


Figura 4b

