

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 482**

51 Int. Cl.:

A61K 49/10 (2006.01) *C07D 257/02* (2006.01)
A61K 49/12 (2006.01)
A61K 51/04 (2006.01)
A61K 51/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 103/00 (2006.01)
A61K 103/20 (2006.01)
A61K 103/30 (2006.01)
A61K 103/32 (2006.01)
C07D 403/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2015 PCT/US2015/029504**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2015 WO15171792**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2015 E 15790006 (9)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 3140282**

54 Título: **Inhibidores de PSMA marcados con metal/radiometal para obtención de imágenes dirigidas a PSMA y radioterapia**

30 Prioridad:

06.05.2014 US 201461989428 P
18.02.2015 US 201562117603 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2020

73 Titular/es:

THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (50.0%)
3400 North Charles Street
Baltimore, MD 21218, US y
NORTHWESTERN UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:

RAY, SANGEETA;
POMPER, MARTIN G.;
MEADE, THOMAS J.;
MEASE, RONNIE C.;
CHEN, YING;
YANG, XING y
ROTZ, MATTHEW

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 743 482 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de PSMA marcados con metal/radiometal para obtención de imágenes dirigidas a PSMA y radioterapia

5 Antecedentes

El antígeno prostático específico de membrana (PSMA) se reconoce cada vez más como un objetivo viable para la obtención de imágenes y la terapia de la próstata y otras formas de cáncer (Ghosh y Heston, 2004; Milowsky et al., 2007; Olson et al., 2007). El PSMA se sobreexpresa significativamente en PCa y metástasis, particularmente con respecto a la forma refractaria a las hormonas (Ghosh y Heston, 2004; Milowsky et al., 2007). También se sabe que el PSMA se expresa por la mayoría de los tumores sólidos y la neovasculatura tumoral (Haffner et al., 2012; Haffner et al., 2009). La obtención de imágenes de PSMA puede proporcionar información sobre la señalización de andrógenos (Evans et al., 2011) y la respuesta a la terapia con taxanos (Hillier et al., 2011). Estudios anteriores han demostrado que la obtención de imágenes de radionúclidos dirigidos a PSMA en modelos experimentales de cáncer de próstata (Schulke et al., 2003; Mease et al., 2013; Banerjee et al., 2010) y en la clínica (Cho et al., 2012; Kulkarni et al., 2014; Zechmann et al., 2014) usando cisteína-glutamato o lisina-glutamato ureas funcionalizadas. Para la fijación de fragmentos moleculares grandes, como complejos de radiometales (^{99m}Tc , ^{68}Ga , ^{111}In , ^{86}Y , ^{203}Pb , ^{64}Cu) (Banerjee, Pullambhatla, Shallal, et al., 2011; Banerjee, Pullambhatla, Byun, et al., 2011; Banerjee et al., 2008) y nanopartículas (Chandran et al., 2008; Kam et al., 2012), se puso un conector largo entre la molécula grande y la urea dirigida para retener la unión dirigida a PSMA. Sin desear quedar ligado a teoría alguna concreta, se pensó que PSMA sería un biomarcador adecuado para la obtención de imágenes moleculares por RM debido a la ubicación extracelular del sitio de unión a ligando y la alta concentración estimada de receptor por célula (~3,2 μM /volumen celular).

La imagen por RM es una herramienta de diagnóstico clínicamente relevante y no invasiva para proporcionar imágenes anatómicas y funcionales de alta resolución. Las imágenes por RM moleculares permiten la visualización de marcadores biológicos *in vivo* (Artemov, Mori, Okollie et al., 2003; Artemov, Mori, Ravi, Bhujwalla, et al., 2003; Konda et al., 2001; Lanza et al., 2004; Huang, et al., 2013). Los agentes de contraste a base de Gd (III) son ampliamente aceptados por los médicos porque son fáciles de administrar y proporcionan contraste positivo ponderado en T₁. Aunque se han realizado progresos en el diseño de agentes de contraste con alta relajación, la sensibilidad sigue siendo un factor limitante para las imágenes por RM moleculares. Para su uso en aplicaciones de imágenes moleculares (específicamente, para obtener imágenes de receptores o expresión de proteínas), los agentes de contraste a base de Gd (III) rara vez exceden el límite de detección (Artemov, Mori, Okollie et al., 2003; Artemov, Mori, Ravi, Bhujwalla, et al., 2003; Konda et al., 2001; Lanza et al., 2004; Huang, et al., 2013). Con las estrategias de amplificación de señal, la RM podría ofrecer una modalidad sensible para la imagen molecular complementaria con respecto a las técnicas basadas en radionúclidos (Aime et al., 2004; Major et al., 2009; Song et al., 2008; Artemov, 2003). Aunque las estrategias de amplificación podrían mejorar la sensibilidad de un agente dirigido, el cambio de un compuesto simple de bajo peso molecular a una entidad multiplexada más grande puede alterar significativamente el perfil farmacocinético del agente (Artemov, Mori, Okollie et al., 2003; Artemov, Mori, Ravi, Bhujwalla, et al., 2003; Konda et al., 2001; Lanza et al., 2004; Huang, et al., 2013). Sherry et al. han abordado el tema de la sensibilidad generando agentes de contraste con afinidades de unión muy altas (K_d) de tal forma que la cantidad de agente necesaria para la detección por RM podría minimizarse (Hanaoka et al., 2008; De Leon-Rodriguez et al., 2010). La combinación de un ligando de alta afinidad específico de receptor junto con agentes multiméricos de Gd (III) para la detección se ha ideado como una solución para permitir la obtención de imágenes de receptor basada en RM (Wu et al. 2012).

Un ejemplo de ese enfoque incluye la obtención de imágenes moleculares de VEGFR2 mediante la preparación de un dendrón de Gd multimérico con altos valores de relajación longitudinal (r_1) (De Leon-Rodriguez et al., 2010). Se han informado otros agentes multiméricos con valores de r_1 mejorados a intensidades de campo más altas ya que las imágenes por RM, tanto experimentales como clínicas, se están moviendo a campos más altos (Mastarone 2011). La optimización de la relajación en campo alto ofrece las ventajas de una mayor relación señal-ruido y contraste-ruido (SNR/CNR) y los beneficios asociados de una mayor resolución espacial y tiempos de adquisición reducidos (Rooney 2007). La combinación de estos conceptos, concretamente, el uso de restos dirigidos de alta afinidad con agentes de contraste multiméricos sensibles, proporciona una justificación para investigar la obtención de imágenes por RM dirigida de células y tejidos que expresan el antígeno prostático específico de membrana (PSMA).

Además, se ha razonado que los agentes a base de urea también podrían usarse para radioterapia de lesiones que contienen PSMA usando radionúclidos. De hecho, los estudios clínicos que utilizan ese enfoque con [^{131}I]MIP1095 (ácido (S)-2-(3-((S)-1-carboxi-5-(3-(4-[^{131}I]yodofenil)ureido)pentil)ureido)pentanodioico) (Zechmann et al., 2014) y agentes dirigidos a PSMA marcados con ^{177}Lu (Kulkarni et al., 2014) están en marcha para el tratamiento de cáncer de próstata resistente a la castración. Esto será en analogía con la radioinmunoterapia (RIT), que ha demostrado ser notablemente exitosa en el tratamiento del linfoma con dos productos comerciales integrados habitualmente en la práctica clínica. Sin embargo, la RIT está plagado de dificultades debido al uso de anticuerpos radiomarcados para la obtención de imágenes, incluyendo tiempos de circulación prolongados, efectos biológicos impredecibles y la necesidad ocasional de estrategias de direccionamiento previo. Además, los anticuerpos pueden tener menos acceso al tumor que los agentes de bajo peso molecular, que pueden manipularse farmacológicamente. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de compuestos de bajo peso molecular con alta afinidad de unión a PSMA para la obtención

de imágenes y la radioterapia de tumores.

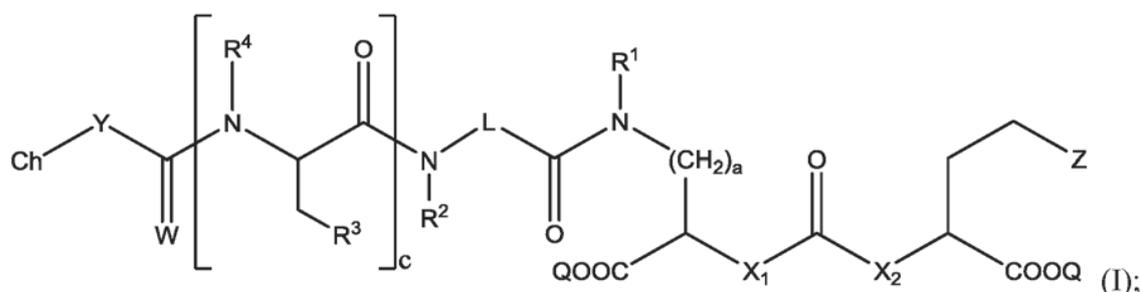
El radionúclido emisor de positrones ^{86}Y (semivida $[t_{1/2}] = 14,74 \text{ h}$, $\beta^+ = 33 \%$, $E_{\beta^+} = 664 \text{ keV}$) es un isótopo atractivo para imagen molecular (Nayak y rechbiel, 2011). El itrio-86 se puede preparar fácilmente en un pequeño ciclotrón biomédico empleando la reacción nuclear $^{86}\text{Sr}(p, n)^{86}\text{Y}$ (Yoo et al., 2005). El uso extensivo del emisor β^+ de alta energía ^{90}Y ($t_{1/2} = 64,06 \text{ h}$, $\beta^- = 72 \%$, $E_{\beta^-} = 2,288 \text{ MeV}$) para endoterapia (Witzig et al., 2003; Bodei et al., 2004) hace que ^{86}Y sea ideal para las estimaciones de dosimetría de radioterapias marcadas con ^{90}Y (Helisch et al., 2004). Los anticuerpos y péptidos radiomarcados con ^{86}Y tienen propiedades idénticas a los marcados con ^{90}Y , lo que permite estimar con precisión la dosis absorbida por ^{90}Y para radioterapias (Nayak y Brechbiel, 2011; Palm et al., 2003). Aunque ^{177}Lu tiene un rango de partículas β más corto ($t_{1/2} = 6,7 \text{ días}$, $E_{\beta^-} = 0,5 \text{ MeV}$) que ^{90}Y , debido a que tienen una química de quelación similar, ^{86}Y se propone como un sustituto de imagen adecuado para investigar posibles radioterapias basadas en ^{177}Lu , así como las radiomarcadas con ^{90}Y . Se ha aplicado una lógica similar a los agentes para la terapia con radionúclidos de receptores peptídicos dirigida al sistema neuroendocrino (Chen et al., 2012). Usando un enfoque similar, se puede usar un radioisótopo de imagen de par emparejado potencial ^{203}Pb (semivida, 51,9 h, $E_{\beta^-} = 279\text{-keV}$ de rayos γ , 81 %) adecuado para imágenes SPECT para el radionúclido terapéutico ^{212}Pb para la terapia de partículas α (Chappell, et al. 2000; Yong, et al. 2011; Yong, et al. 2012; Yong, et al. 2013). El esquema de desintegración de ^{212}Pb incluye ^{212}Bi , que produce una partícula α , dos partículas β y varias emisiones de γ tras la desintegración. Los emisores de partículas α son particularmente atractivos para la radioterapia dirigida debido a las altas propiedades de transferencia de energía lineal, tal como la ionización densa localizada, que da como resultado roturas bicatenarias de ADN irreparables y una citotoxicidad que es independiente del contenido de oxígeno tisular o la tasa de dosis (McDevitt, et al., 1998). ^{212}Pb y ^{212}Bi son ambas fuentes prometedoras de emisión de partículas α que tienen una radioquímica ya descrita para la unión de anticuerpos y se obtienen fácilmente a partir de un generador de ^{224}Ra .

Banerjee et al., O-065 *Prelinical evaluation ^{86}Y -Labeled inhibitors of prostate specific membrane antigen*, J Label Compd Radiopharm 2011; 54: S65 analiza el potencial de direccionamiento tumoral de tres inhibidores de urea ^{86}Y -DOTA. El documento WO 2014/110372 se refiere a inhibidores de PSMA. Leon-Rodriguez et al., MRI Detection of VEGFR2 *in Vivo* Using a Low Molecular Weight Peptoid-(Gd)8-Dendron for Targeting, J. Am. Chem. Soc, 2010, 132, 12829-12831, analizan un dendrón de polilisina que contiene ocho unidades GdDOTA conjugadas con un dímero peptóide que se sabe que tiene una alta afinidad por VEGFR2. Wu et al., Synthesis and Evaluation of a Peptide Targeted Small Molecular Gd-DOTA Monoamide Conjugate for MR Molecular Imaging of Prostate Cancer, Bioconjugate Chem., 2012, 23, 1548-1556, se refieren a quelatos de Gd (III) dirigidos al péptido CLT1 de bajo peso molecular. El documento WO 2013/022797 se refiere a inhibidores de PSMA.

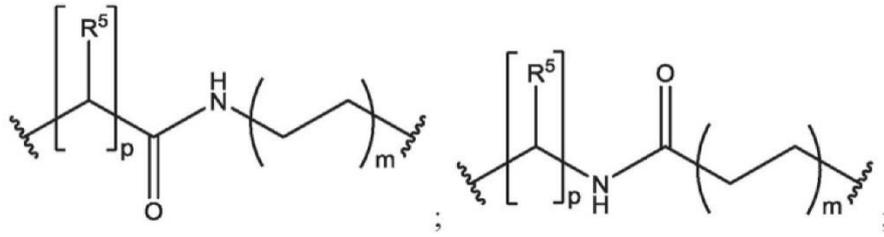
También se han desarrollado inhibidores de PSMA a base de carbamatos radiohalogenados que también demostraron una alta afinidad de unión a PSMA *in vitro*, y cuando se radiomarcaron con el emisor de positrones F-18 mostraron una alta captación en xenoinjertos de tumor de ratón PSMA positivo con depuración rápida de tejidos normales. Debido al perfil farmacocinético favorable de esta clase de compuestos, es decir, baja unión inespecífica, falta de metabolismo *in vivo* y tiempos de residencia tumoral razonables, los estudios de imagen se han extendido a la radioterapia molecular. Además, el inhibidor a base de carbamato se puede acoplar al agente quelante de metales empleando una funcionalidad de enlazador similar a los agentes basados en metal/radiometal a base de urea para mantener una alta afinidad de unión por PSMA. En consecuencia, el andamio de carbamato conjugado de metal o radiometal también se puede utilizar para la obtención de imágenes y la terapia de células y tejidos que expresan PSMA.

Sumario

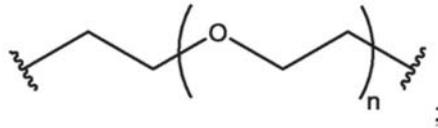
En algunos aspectos, la materia objeto actualmente divulgada proporciona compuestos de Fórmula (I):



en la que: Z es tetrazol o CO_2Q ; Q es H o un grupo protector; cada uno de X_1 y X_2 es independientemente NH u O; a es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3 y 4; c es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3 y 4; cada R^1 , R^2 y R^4 son independientemente H o alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$; cada R^3 es independientemente H, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ o arilo $\text{C}_2\text{-C}_{12}$; W es independientemente O o S; Y es -NH- y puede estar presente o ausente; L es un enlazador, en la que el enlazador se selecciona del grupo que consiste en:



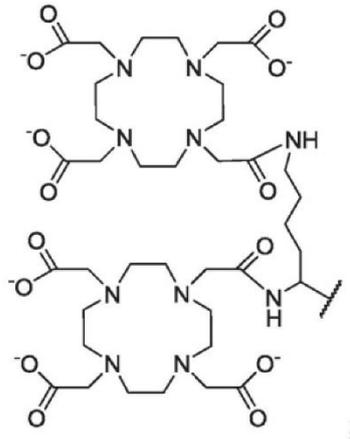
y



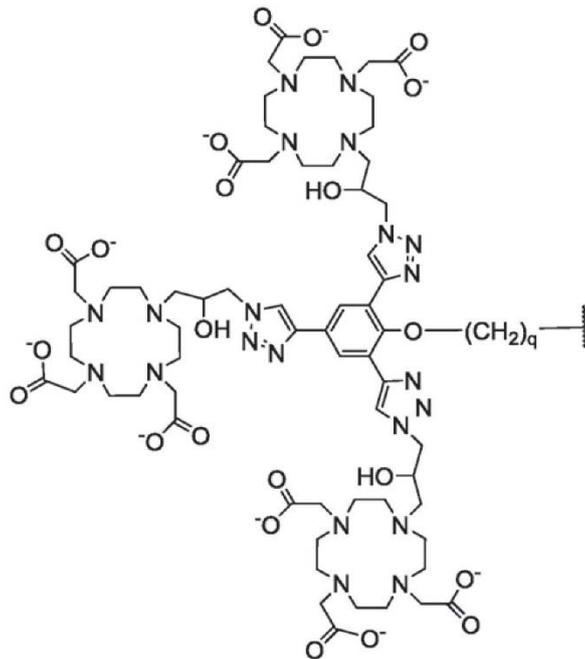
5

en la que: m es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8; cada R⁵ es independientemente H o -COOR⁶, en la que cada R⁶ es independientemente H o un alquilo C₁-C₆; n es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12; p es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8; Ch es un resto quelante que puede comprender uno o más metales o radiometales, en la que el resto quelante se selecciona del grupo que consiste en:

10



15 y



en la que q es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

- 5 En otros aspectos, la materia objeto actualmente divulgada proporciona un método para obtener imágenes o tratar uno o más tumores o células de antígeno prostático específico de membrana (PSMA), comprendiendo el método poner en contacto el uno o más tumores o células con una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) y formar una imagen.
- 10 Habiéndose indicado anteriormente en el presente documento ciertos aspectos de la materia objeto divulgada actualmente, que se abordan en su totalidad o en parte por la materia objeto divulgada actualmente, otros aspectos serán evidentes a medida que avance la descripción cuando se tome en relación con los Ejemplos y Figuras adjuntos, como se describe mejor a continuación.

15 Breve descripción de las figuras

Habiendo así descrito la materia objeto actualmente divulgada en términos generales, ahora se hará referencia a las Figuras adjuntas, que no están necesariamente dibujadas a escala, y en las que:

- 20 Las figuras 1A y 1B son: (A) estructuras de **Gd1**, **Gd2** y **Gd3** y (B) curvas de Cl_{50} ; la figura 2 muestra la concentración de **Gd1-Gd3** en sedimentos de células de gripe PC3 PSMA- (azul) y PIP PC3 PSMA+ (rojo); los datos se obtuvieron de análisis ICP-MS;
- 25 la figura 3 muestra el porcentaje de dosis incubada (% de ID) internalizada y la superficie celular unida para **Gd1** y **Gd2**; los datos se obtuvieron de análisis ICP-MS;
- 30 la figura 4A a la figura 4C muestran la mejora del contraste en T_1 generada por **Gd3** en un par de células de cáncer de próstata PC3 humano isogénico, células PIP PSMA+ y gripe PSMA-; (A) Mapas de T_1 codificados por colores de células de PIP y gripe. Las tasas de relajación se determinaron a 25 °C a 9,4 T; (B) Cuantificación de los cambios en T_1 (ΔT_1) en células PIP y de gripe ($n = 4$, $P < 0,05$) después del tratamiento con **Gd3**; (C) captación celular de **Gd3** en células de PIP y gripe. La cantidad de Gd (III) asociada con los sedimentos de células PIP fue significativamente mayor que para los sedimentos de células de gripe. La acumulación de **Gd3** en células PIP se bloqueó por preincubación con ZJ43 ($n = 4$, $P < 0,05$);
- 35 la figura 5A a la figura 5D muestran (A) la captación celular y la internalización de **Gd1-Rh** mediante imágenes de fluorescencia; las células PIP PC3 PSMA+ y gripe PC3 PSMA- se incubaron con una solución diluida en serie de **Gd1-Rh** (4 μ M - 4 nM) durante 30 min a 37 °C seguido de la eliminación del exceso de agentes de contraste con PBS frío; la vista ampliada de PIP PC3 (B) y gripe PC3 (C) a una concentración de 4 nM del agente de contraste; la fluorescencia de rodamina se muestra en rojo, y los núcleos contrañeidos con DAPI se muestran en azul; (D) la estructura de **Gd1-Rh**;
- 40 la figura 6A y la figura 6B muestran el % de ID de la superficie celular **Gd3** unida (A) e internalizada (B) en 1, 4 y 24 h;
- 45 la figura 7 muestra la viabilidad de las células de gripe PC3 PSMA- incubadas con **Gd1**, **Gd2**, **Gd3** y Prohance; los agentes de contraste se incubaron con células a diversas concentraciones de Gd durante 24 horas a 37 °C y la viabilidad se midió usando un ensayo MTS; las mediciones de viabilidad se normalizaron con respecto a células cultivadas en ausencia de cualquier agente de contraste;
- 50 la figura 8 muestra la viabilidad de células PIP PC3 PSMA+ incubadas con **Gd1**, **Gd2**, **Gd3** y Prohance (Gd-DOTA); los agentes de contraste se incubaron con células a diversas concentraciones de Gd durante 24 horas a 37 °C y la viabilidad se midió usando un ensayo MTS; las mediciones de viabilidad se normalizaron con respecto a células cultivadas en ausencia de cualquier agente de contraste;
- 55 la figura 9A y la figura 9B muestran imágenes de RM de **Gd3** de xenoinjertos tumorales de PIP PSMA+ y gripe PSMA- de cáncer de próstata PC3 humano en ratones NOD/SCID macho. (A) Los mapas de mejora (% de ΔR_1) en los tumores de PIP PC3 PSMA+ y gripe PC3 PSMA- se superponen a imágenes ponderadas en T_2 en 40 min, 80 min, 120 min y 160 min después de una sola inyección en bolo de **Gd3** en la vena de la cola; (B) mapas del % de ΔR_1 en tumores PSMA+ y PSMA- de un agente de contraste de Gd trimérico sin un resto de direccionamiento a PSMA 40 min, 80 min, 120 min y 160 min después de una sola inyección en bolo de **Gd3** en la vena de la cola;
- 60 la figura 10A y la figura 10B muestran (A) transcurros de tiempo T_1 calculados para todo el volumen de cada tumor durante 1-1600 min después de la inyección; y (B) la región ampliada del transcurso de tiempo en 0-200 min; se apreció una mejora altamente específica y persistente en los tumores PIP PC3 PSMA+;
- 65 la figura 11 muestra el cambio porcentual en la relajación (% de ΔR_1) para los ratones después de la inyección con una dosis de 0,05 mmol/kg ($n = 3$) de **Gd3**. ($p < 0,03$, PIP:gripe);
- la figura 12 muestra los cambios *in vivo* dependientes del tiempo en los valores de T_1 del tumor ($n = 1$) antes y después de la inyección de un PBS 1X (solución salina tamponada con fosfato);
- la figura 13A y la figura 13B muestran (A) imágenes por RM seleccionadas presentadas en la figura 11; y (B) la estructura de **Gd3**;
- la figura 14 muestra las estructuras de inhibidores marcados con ^{86}Y de PSMA;
- la figura 15A y la figura 15B muestran cromatogramas preparativos de HPLC para [^{86}Y]**4**; (A) pico de radio-HPLC; y (B) el pico UV en 18,6 min es para **4** sin quelar a $\lambda = 254$ nm;
- la figura 16A y la figura 16B muestran cromatogramas preparativos de HPLC para [^{86}Y]**5**; (A) pico de radio-HPLC

y (B) el pico de UV en 34 min es para **5** sin quelar a $\lambda = 254$ nm;
 la figura 17A a 17C muestran cromatogramas preparativos de HPLC para [⁸⁶Y]**6**: (A) pico de radio-HPLC; (B) el pico de UV en 15,8 min es para **6** sin quelar a $\lambda = 220$ nm; y (C) el cromatograma de HPLC para [⁸⁶Y]**6** puro;
 la figura 18A a 18C muestran imágenes PET-CT de cuerpo entero de (A) ⁸⁶Y-**4**, (B) ⁸⁶Y-**5** y (C) ⁸⁶Y-**6** en ratones portadores de tumores PIP PC3 PSMA+ y gripe PC3 PSMA- 2 h después de la inyección. Se inyectó a los ratones ~3,3 mBq (90 μ Ci) de radiotrazador por vía intravenosa (IV). PIP PC3 PSMA+ (flecha de color negro); gripe PC3 PSMA- (flecha de color blanco); K = riñón; GB = vesícula biliar; GI = tracto gastrointestinal; L = izquierda; R = derecha. Las imágenes se corrigen en cuanto a la desintegración y se ajustan al mismo valor máximo;
 las figuras 19A y 19B muestran imágenes PET-CT de [⁸⁶Y]-**4** en ratones portadores de tumores PIP PC3 PSMA+ y gripe PC3 PSMA-. Las imágenes se obtuvieron (A) sin, y (B) con bloqueo de PSMA usando potente inhibidor selectivo de PSMA, ZJ43, como el agente de bloqueo (50 mg/kg). La reducción de la captación de radiotrazadores tanto en el tumor como en los riñones (otro sitio PSMA+) tras el tratamiento conjunto con ZJ43 proporcionó una verificación adicional sobre la unión específica de PSMA. A los ratones se les inyectó ~6,2 MBq (168 μ Ci) de radiotrazador IV. PIP PC3 PSMA+ (flecha de color negro); gripe PC3 PSMA- (flecha de color blanco); K = riñón; B = vejiga; L = izquierda; R = derecha. Las imágenes se corrigen en cuanto a la desintegración y se ajustan al mismo valor máximo; la figura 19C muestra la estructura del potente inhibidor selectivo de PSMA ZJ43;
 la figura 20A a la figura 20C muestran imágenes PET-CT de ⁸⁶Y-**6** en ratones portadores de tumores PIP PC3 PSMA+ y gripe PC3 PSMA- (A) 0,5 h después de la inyección, (B) 2 h después de la inyección y (C) 12 h después de la inyección. A los ratones se les inyectó ~6,2 MBq (160 μ Ci) de radiotrazador IV. PIP PC3 PSMA+ (flecha de color negro); gripe PC3 PSMA- (flecha de color blanco); K = riñón; L = izquierda; R = derecha. Las imágenes se corrigen en cuanto a la desintegración y se ajustan al mismo valor máximo;
 la figura 21A y la figura 21B muestran la visualización de MIP (reproyección de intensidad máxima) en el tiempo 3D de PET ⁸⁶Y-**6** en un babuino (A) 1-2 h después de la inyección y (B) 2-3,5 h después de la inyección. Para mejorar la visualización, las radiactividades de la vejiga se segmentaron semiautomáticamente utilizando un método de umbral y posteriormente se eliminaron. La representación de MIP en 3D se empleó para proporcionar una visión general de la distribución de radiotrazador en todo el cuerpo. Se observó poco radiotrazador en la mayoría de los tejidos normales, excepto en la vejiga (no mostrado) y el riñón (K). El animal fue cateterizado para este estudio. Se observó una captación leve en las glándulas lagrimales, parótidas y glándulas salivales (flechas cortas, largas y de color blanco, respectivamente);
 la figura 22 muestra las estructuras de ¹⁷⁷Lu-SRV**171** y los agentes propuestos relacionados para mejorar aún más la farmacocinética *in vivo*;
 la figura 23 muestra el porcentaje de incubación de la dosis (ID) de ¹⁷⁷Lu-SRV**171** (0,01-10 μ Ci/millón de células de PIP PSMA+ y grupo PSMA- después de 2 h a 37 °C. La especificidad de captación se verificó adicionalmente por incubación conjunta de 10 μ M de ZJ43;
 la figura 24 muestra el estudio de internalización de ¹⁷⁷Lu-SRV**171** (1 μ Ci) hasta 24 h;
 la figura 25A a la figura 25C muestran imágenes SPECT de un ratón macho portador de tumor PIP y de gripe usando ¹⁷⁷Lu-SRV**171** (500 μ Ci) (A) 2 h después de la inyección, (B) 24 h después de la inyección y (C) 96 h después de la inyección. Se encontró baja captación en el riñón (K), la vejiga (B) y tumor de gripe.
 la figura 26 muestra la biodistribución tisular de ¹⁷⁷Lu-SRV**171** en diferentes órganos 3 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h después de la inyección;
 la figura 27 muestra las estructuras de ²⁰³Pb-SR-IX-**11** y ²⁰³Pb-SRV**171**;
 la figura 28A a 28C muestran imágenes SPECT-CT de un ratón macho portador de tumor PIP y de gripe usando ²⁰³Pb-SRV**171** (izquierda) y ²⁰³Pb-SR-IX-**11** (derecha) (A) 60 min después de la inyección, (B) 120 min después de la inyección y (C) 240 min después de la inyección;
 la figura 29 muestra dos andamios de lisina-carbamato utilizados para diseñar compuestos de la materia objeto divulgada actualmente: ácido oxipentanodioico (OPA) correspondiente a un andamio de carbamato y ácido aminopentanodioico (NPA) correspondiente a un andamio de carbamato "inverso";
 la figura 30 muestra el cromatograma de HPLC de ZCP-**01**;
 la figura 31 muestra la espectrometría de masas por ionización por electronebulización (ESI-MS) de [In] ZCP-**01** frío;
 la figura 32 muestra el cromatograma de HPLC de [In] ZCP-**01** frío;
 Las figuras 33A y 33B muestran los cromatogramas de HPLC preparativa para [In] ZCP-**01**; (A) pico de radio-HPLC; y (B) el pico UV en 32 min es para ZCP-01 sin quelar a $\lambda = 200$ nm; y
 las figuras 34A a 34C muestran la captación de [¹¹¹In]ZCP-**01** en ratones portadores de xenoinjertos de tumor PIP PC3 PSMA+ y gripe PC PSMA- (A) 2 h, (B) 4 h y (C) 24 h después de la inyección.

Descripción detallada

La materia objeto divulgada actualmente se describirá ahora más completamente en lo sucesivo en el presente documento con referencia a los Ejemplos y Figuras adjuntos, en los que se muestran algunas, pero no todas las realizaciones de la materia objeto divulgada actualmente.

I. INHIBIDORES DE PSMA MARCADOS CON METAL/RADIOMETAL PARA OBTENCIÓN DE IMÁGENES DIRIGIDAS A PSMA Y RADIOTERAPIA

La obtención de imágenes por resonancia magnética (RM) es ventajosa porque puede proporcionar información

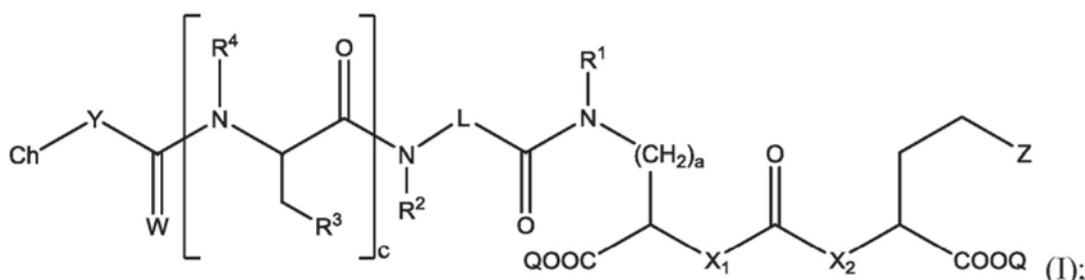
anatómica, funcional y molecular al mismo tiempo. La imagen por RM molecular puede combinar la ubicuidad de esta modalidad clínica establecida y su alta resolución espacial con el perfil molecular *in vivo*. Sin embargo, debido a la sensibilidad intrínsecamente baja de la RM, se requieren altas concentraciones locales de objetivos biológicos para generar un contraste discernible de RM.

5 Sin desear quedar ligado a teoría alguna concreta, se pensó que el PSMA sería un buen objetivo para los agentes de imagen molecular por RM debido a la alta concentración objetivo por célula (aproximadamente 3 μM /volumen celular), así como la ubicación extracelular del sitio de unión a ligando. El enfoque divulgado actualmente está dirigido a mejorar la afinidad de unión (K_d más bajo) de los agentes de contraste para un objetivo molecular o celular específico, de manera que la cantidad de agente necesaria para la detección por RM será mucho menor. Por consiguiente, el enfoque divulgado actualmente combina un ligando específico del receptor de alta afinidad de unión con agentes multiméricos de Gd (III) como una posible solución para la imagen molecular basada en RM.

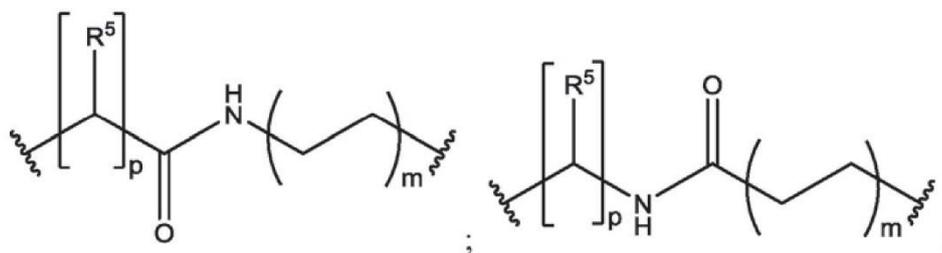
15 Anteriormente, se demostró con éxito la obtención de imágenes PET (^{64}Cu) y SPECT (^{111}In y $^{99\text{m}}\text{Tc}$) basadas en radiometal usando inhibidores de PSMA radiomarcados basados en urea en ratones. Se desarrolló una estrategia tripartita que contiene: (i) un resto de direccionamiento a PSMA, (ii) un enlazador para el ajuste farmacocinético, y (iii) un agente quelante para permitir la unión de radionúclidos. Esta estrategia incluía agentes conjugados DOTA marcados con ^{86}Y para imágenes PET y para servir como modelo de radioterapia con los correspondientes agentes marcados con ^{90}Y . Debido a que DOTA es un agente quelante fuerte para muchos metales, los mismos conjugados DOTA se pueden usar con otros radionúclidos radioterapéuticos, tales como Lu-177, Ac-225, Bi-213, Bi-212, Pb-212, Cu-67, y Sc-47. En la materia objeto divulgada actualmente, se utilizó la misma construcción de enlazador de urea y se aumentó el número de quelatos de Gd (Gd mono, di y trimérico) para optimizar el comportamiento relaxométrico o la sensibilidad a la RM como agentes de contraste de alto campo, así como su afinidad de unión, para investigar sistemáticamente la posibilidad de imágenes por RM de basadas en PSMA de PCa.

25 **A. Compuestos de Fórmula (I)**

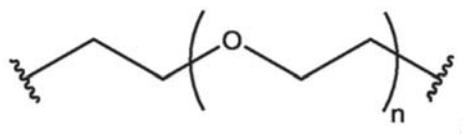
Por consiguiente, en algunas realizaciones, la materia objeto divulgada actualmente proporciona un compuesto de fórmula (I):



35 en la que: Z es tetrazol o CO_2Q ; Q es H o un grupo protector; cada uno de X_1 y X_2 es independientemente NH u O; a es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3 y 4; c es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3 y 4; cada R^1 , R^2 y R^4 son independientemente H o alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$; cada R^3 es independientemente H, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ o arilo $\text{C}_2\text{-C}_{12}$; W es independientemente O o S; Y es -NH- y puede estar presente o ausente; L es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en:



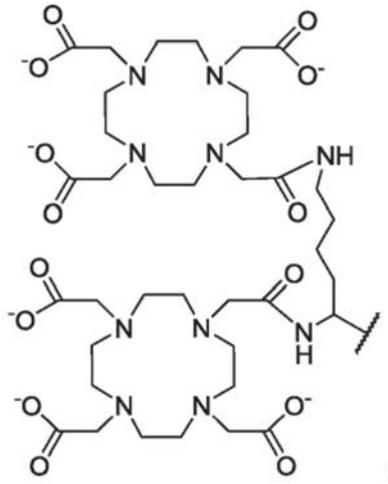
y



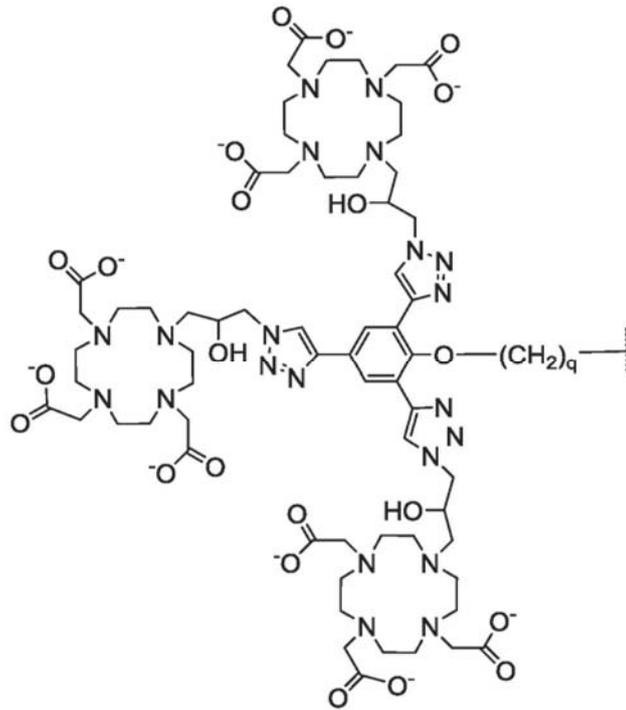
en la que: m es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8;

cada R^5 es independientemente H o $-\text{COOR}^6$, en la que cada R^6 es independientemente H o un alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$; n es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12; p es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8; Ch es un resto quelante que puede comprender uno o más metales o radiometales, en la que el resto quelante se selecciona del grupo que consiste en:

5



y



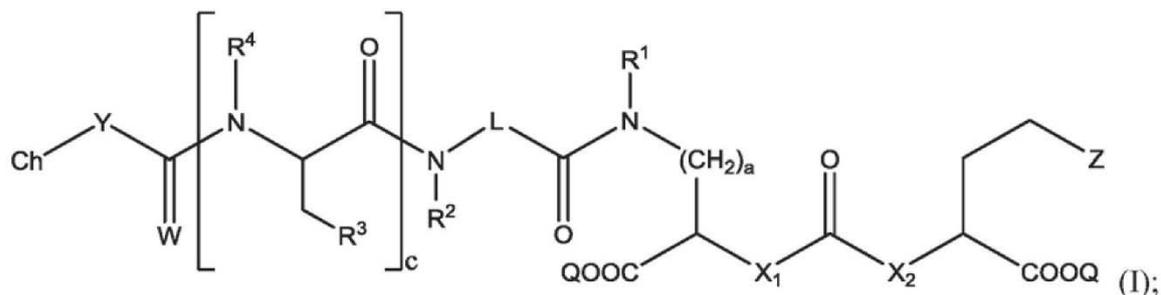
10

en la que q es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15

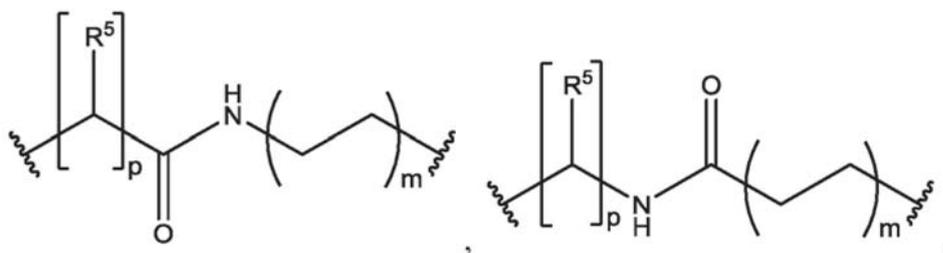
En aún realizaciones más particulares, el compuesto de Fórmula (I) se selecciona del grupo que consiste en:

comprendiendo el método poner en contacto el uno o más tumores o células con una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) y formar una imagen, comprendiendo el compuesto de fórmula (I):



5 en la que: Z es tetrazol o CO₂Q; Q es H o un grupo protector; cada uno de X₁ y X₂ es independientemente NH u O; a es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3 y 4; c es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3 y 4; cada R¹, R², R³ y R⁴ son independientemente H o alquilo C₁-C₄; W es independientemente O o S; Y es -NH- y puede estar presente o ausente; L es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en:

10



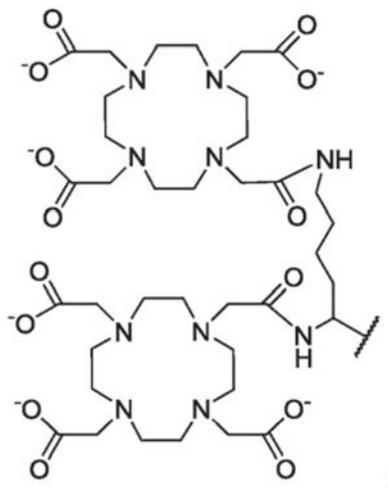
y



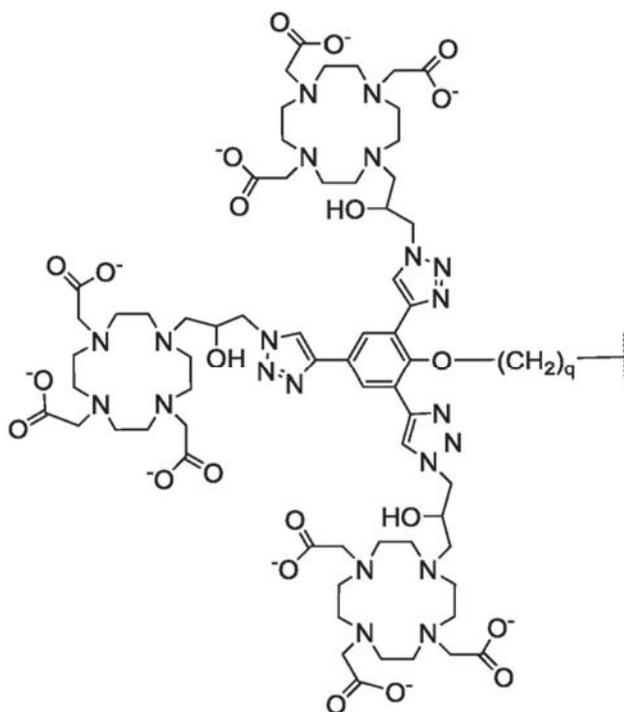
15

en la que: m es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8; cada R⁵ es independientemente H o -COOR⁶, en la que cada R⁶ es independientemente H o un alquilo C₁-C₆; n es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12; p es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8; Ch es un resto quelante que puede comprender uno o más metales o radiometales, en la que el resto quelante se selecciona del grupo que consiste en:

20



25 y



en la que q es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5

"Contacto" significa cualquier acción que dé como resultado al menos un compuesto que comprenda el agente de imagen de la materia objeto divulgada actualmente que entra en contacto físicamente con al menos un tumor o célula que expresa PSMA. El contacto puede incluir exponer la célula o células o el tumor o tumores al compuesto en una cantidad suficiente para dar como resultado el contacto de al menos un compuesto con al menos una célula o tumor.

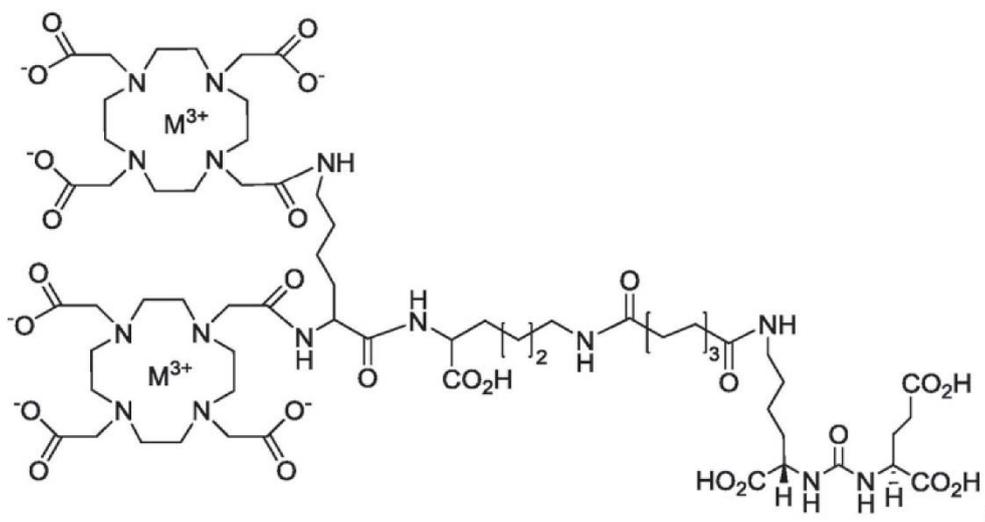
10 El método se puede poner en práctica *in vitro* o *ex vivo* introduciendo, y preferiblemente mezclando, el compuesto y la célula o células o el tumor o tumores en un entorno controlado, tal como una placa o tubo de cultivo. El método se puede poner en práctica *in vivo*, en cuyo caso el contacto significa exponer al menos una célula o tumor en un sujeto al menos a un compuesto de la materia objeto divulgada actualmente, tal como administrar el compuesto a un sujeto por cualquier ruta adecuada. De acuerdo con la materia objeto divulgada actualmente, el contacto puede comprender introducir, exponer y similares, el compuesto en un sitio distante a las células a contactar, y permitir las funciones corporales del sujeto, o movimientos naturales (por ejemplo, difusión) o inducidos por el hombre (por ejemplo, remolinos) de los fluidos para dar como resultado el contacto del compuesto y la célula o células o el tumor o tumores.

15 En algunas realizaciones, el tumor o la célula se encuentra *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*.

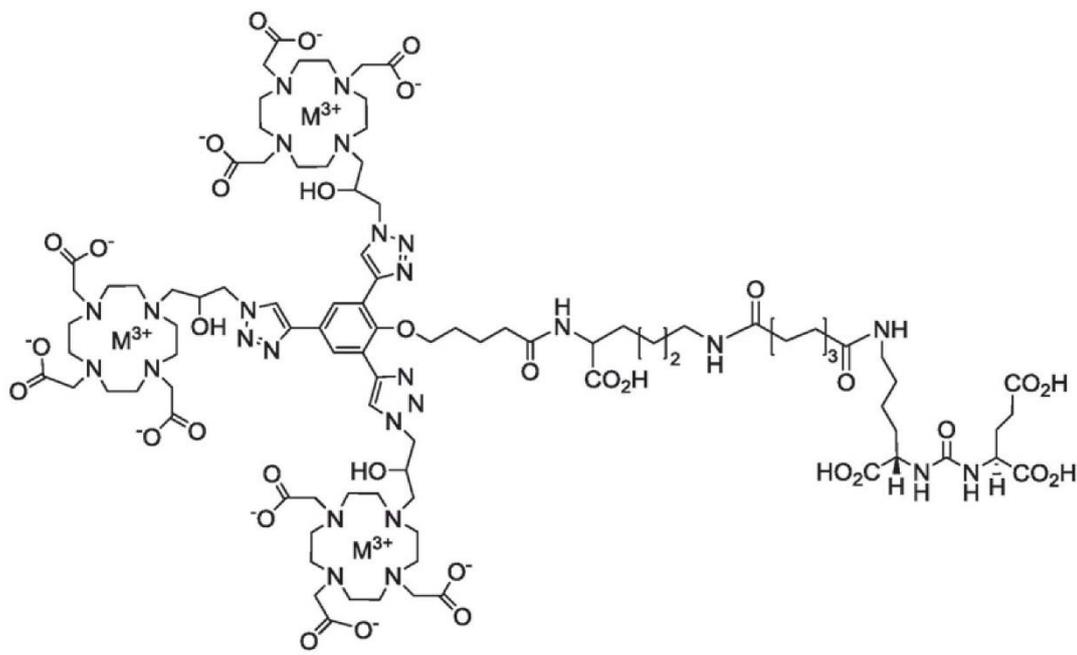
20 Por "formar una imagen", se entiende el uso de una resonancia magnética (RM) (imanes que polarizan y excitan los núcleos de hidrógeno en las moléculas de agua en el tejido para producir una señal detectable) para formar una imagen de una célula, tejido, tumor, parte del cuerpo y similares.

En realizaciones aún más particulares, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

25



y



5

en las que:

- 10 x se selecciona del grupo que consiste en 2 y 3;
 M es un metal o un radiometal; o
 una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 En algunas realizaciones, el metal se selecciona del grupo que consiste en Gd, Lu, Ac, Bi, Pb, Cu, In, Sc, e Y. En realizaciones particulares, el metal o el radiometal se selecciona del grupo que consiste en Gd-157, Lu-177, Ac-225, Bi-203, Pb-210, Cu-67, In-111, 44Sc-/47Sc, e Y-90. En aún realizaciones más particulares, para aplicaciones de IRM, el metal no radioactivo es Gd-157 (isótopo estable); para aplicaciones de radioterapia, el radiometal se selecciona del grupo que consiste en Lu-177, Ac-225, Bi-203, Pb-210, Cu-67, In-111, Sc-47, e Y-90; para la obtención de imágenes por PET, el radiometal se selecciona del grupo que consiste en Y-86 y Sc-44; y para aplicación de SPECT, el radiometal se selecciona del grupo que consiste en Lu-177 e In-111.

20

25 En ciertas realizaciones, el uno o más tumores o células que expresan PSMA se seleccionan del grupo que consiste en: un tumor o célula de próstata, un tumor o célula de próstata metastatizada, un tumor o célula de pulmón, un tumor o célula de riñón, un glioblastoma, un tumor o célula de páncreas, un tumor o célula de vejiga, un sarcoma, un melanoma, un tumor o célula de mama, un tumor o célula de colon, una célula germinal, un feocromocitoma, un tumor o célula esofágica, un tumor o célula de estómago, y combinaciones de los mismos. En aún ciertas realizaciones

adicionales, el uno o más tumores o células que expresan PSMA es un tumor o célula de próstata.

En algunas realizaciones, el uno o más tumores o células que expresan PSMA está *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*. En realizaciones particulares, el uno o más tumores o células que expresan PSMA están presentes en un sujeto.

5 En algunas realizaciones, el tumor o la célula se encuentra en un sujeto. El sujeto tratado por los métodos divulgados actualmente en sus muchas realizaciones es deseablemente un sujeto humano, aunque debe entenderse que los métodos descritos en el presente documento son eficaces con respecto a todas las especies de vertebrados, que pretenden incluirse en el término "sujeto". Por consiguiente, un "sujeto" puede incluir un sujeto humano con fines médicos, tal como el tratamiento de una afección o enfermedad existente, o el tratamiento profiláctico para prevenir el inicio de una afección o enfermedad, o un sujeto animal (no humano) para fines médicos, veterinarios, o de desarrollo. Los sujetos animales adecuados incluyen mamíferos incluyendo, pero sin limitación, primates, por ejemplo, seres humanos, monos, simios y similares; bovinos, por ejemplo, ganado, bueyes y similares; ovinos, por ejemplo, ovejas y similares; caprinos, por ejemplo, cabras y similares; porcinos, por ejemplo, cerdos, cerdas y similares; equinos, por ejemplo, caballos, burros, cebras y similares; felinos, incluyendo gatos salvajes y domésticos; caninos, incluyendo perros; lagomorfos, incluyendo conejos, liebres y similares; y roedores, incluyendo ratones, ratas, y similares. Un animal puede ser un animal transgénico. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano incluyendo, pero sin limitación, sujetos fetales, neonatales, lactantes, juveniles y adultos. Además, un "sujeto" puede incluir un paciente afectado o sospechoso de estar afectado por una afección o enfermedad. Por lo tanto, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En otras realizaciones, el sujeto no es un ser humano.

25 En algunas realizaciones, una cantidad detectablemente eficaz del agente de formación de imágenes de los métodos divulgados actualmente se administra a un sujeto. De acuerdo con la materia objeto divulgada actualmente, "una cantidad detectablemente eficaz" del agente de formación de imágenes se define como una cantidad suficiente para producir una imagen aceptable usando un equipo que está disponible para uso clínico. Una cantidad detectablemente eficaz del agente de formación de imágenes puede administrarse en más de una inyección. La cantidad detectablemente eficaz del agente de formación de imágenes 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, y los factores relacionados con el instrumento y la película. La optimización de dichos factores está dentro del nivel de habilidad en la técnica.

35 Es preferible que los compuestos de la materia objeto divulgada actualmente se excreten rápidamente de los tejidos del cuerpo. Típicamente, los compuestos de la materia objeto divulgada actualmente se eliminan del cuerpo en menos de aproximadamente 24 horas. Más preferiblemente, los compuestos de la materia objeto divulgada actualmente 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.

40 En algunas realizaciones, los métodos divulgados actualmente comprenden la depuración del compuesto que comprende el agente de formación de imágenes del tumor o la célula en el sujeto. Al menos una ventaja de los métodos divulgados actualmente es que, en algunas realizaciones, hay una eliminación más rápida del compuesto que comprende el agente de formación de imágenes de los riñones que del tumor del sujeto.

45 En algunas realizaciones, los métodos divulgados actualmente usan compuestos que son estables *in vivo* de modo que sustancialmente todo, por ejemplo, más de aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o más preferiblemente el 90 % del compuesto inyectado es no metabolizado por el cuerpo antes de la excreción. En otras realizaciones, el compuesto que comprende el agente de formación de imágenes es estable *in vivo*.

50 C. Definiciones

i. Definiciones químicas

55 Aunque los expertos en la técnica entienden bien los siguientes términos en relación con los compuestos de fórmula (I), las siguientes definiciones se exponen para facilitar la explicación de la materia objeto divulgada actualmente.

60 Los términos sustituido, ya sea precedido por el término "opcionalmente" o no, y sustituyente, como se usa en el presente documento, se refieren a la capacidad, como se apreciará por un experto en esta técnica, de cambiar un grupo funcional por otro grupo funcional siempre que se mantenga la valencia de todos los átomos. Cuando más de una posición en cualquier estructura dada puede sustituirse con más de un sustituyente seleccionado de un grupo específico, el sustituyente puede ser igual o diferente en cada posición. Los sustituyentes también pueden estar sustituidos adicionalmente (por ejemplo, un sustituyente del grupo arilo puede tener otro sustituyente fuera de él, tal como otro grupo arilo, que está sustituido adicionalmente, por ejemplo, con flúor en una o más posiciones).

65 Cuando los grupos de sustituyentes o grupos de enlace se especifican por sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, estas también incluyen los sustituyentes químicamente idénticos que resultarían de escribir la estructura de derecha a izquierda, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{O}-$ es equivalente a $-\text{OCH}_2-$; $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ es equivalente

a -OC(=O)-; -OC(=O)NR- es equivalente a -NRC(=O)O-.

Como se usa en el presente documento, cuando un sustituyente interno está flanqueado por enlaces (por ejemplo, -NRC(O)-), el orden de los átomos es fijo, la orientación del grupo no puede invertirse, y se inserta en una estructura en la orientación presentada. En otras palabras, NRC(O)- no es lo mismo que -C(O)NR-. Como se usa en el presente documento, el término C(O) (por ejemplo, -NRC(O)-) se usa para indicar un grupo carbonilo (C=O), donde el oxígeno está unido al carbono mediante un doble enlace.

Cuando se usa el término "seleccionado independientemente", los sustituyentes a los que se hace referencia (por ejemplo, grupos R, tales como grupos R₁, R₂, y similares, o variables, tales como "m" y "n"), pueden ser idénticos o diferentes. Por ejemplo, tanto R₁ como R₂ pueden ser alquilos sustituidos, o R₁ puede ser hidrógeno y R₂ puede ser un alquilo sustituido, y similares.

Los términos "un" o "una", cuando se usan en referencia a un grupo de sustituyentes en el presente documento, significan al menos uno. Por ejemplo, cuando un compuesto está sustituido con "un" alquilo o arilo, el compuesto está opcionalmente sustituido con al menos un alquilo y/o al menos un arilo. Además, cuando un resto está sustituido con un sustituyente R, el grupo se puede denominar "sustituido con R". Cuando un resto está sustituido con R, el resto está sustituido con al menos un sustituyente R y opcionalmente cada sustituyente R es distinto.

Un denominado "R" o grupo generalmente tendrá la estructura que se reconoce en la técnica como correspondiente a un grupo que tiene ese nombre, a menos que se especifique de otro modo en el presente documento. Para propósitos de ilustración, se definen a continuación ciertos grupos representativos "R" como se expone anteriormente.

La descripción de los compuestos de la presente divulgación está limitada por los principios del enlace químico conocidos por los expertos en la técnica. Por consiguiente, cuando un grupo puede sustituirse por uno o más de un número de sustituyentes, dichas sustituciones se seleccionan para cumplir con los principios de enlace químico y para dar compuestos que no son intrínsecamente inestables y/o que un experto en la técnica conocería que son inestables en condiciones ambientales, tales como condiciones acuosas, neutras, y algunas condiciones fisiológicas conocidas. Por ejemplo, un heterocicloalquilo o heteroarilo está unido al resto de la molécula mediante un heteroátomo en el anillo de acuerdo con los principios de unión química conocidos por los expertos en la técnica, evitando de este modo compuestos inherentemente inestables.

El término hidrocarburo, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier grupo químico que comprende hidrógeno y carbono. El hidrocarburo puede estar sustituido sin sustituir. Como sabrá un experto en esta técnica, todas las valencias deben satisfacerse al hacer cualquier sustitución. El hidrocarburo puede ser insaturado, saturado, ramificado, no ramificado, cíclico, policíclico o heterocíclico. Los hidrocarburos ilustrativos se definen adicionalmente en el presente documento a continuación e incluyen, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, ciclopropilo, alilo, vinilo, n-butilo, *terc*-butilo, etinilo, ciclohexilo.

El término "alquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se indique de otra manera, un grupo hidrocarburo acíclico o cíclico de cadena lineal (es decir, no ramificado) o ramificado, o una combinación de los mismos, que puede estar completamente saturado, mono o poliinsaturado y puede incluir grupos di y multivalentes, que tienen el número de átomos de carbono designado (es decir, C₁-C₁₀ significa de uno a diez carbonos). En realizaciones particulares, el término "alquilo" se refiere a radicales hidrocarburo C₁₋₂₀ inclusive, lineales (es decir, "cadena lineal"), ramificados o cíclicos, saturados o al menos parcialmente, y en algunos casos, totalmente insaturados (es decir, alqueno y alquino) derivados de un resto hidrocarburo que contiene entre uno y veinte átomos de carbono mediante la eliminación de un solo átomo de hidrógeno.

Los grupos hidrocarburo saturados representativos incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, *terc*-butilo, n-pentilo, sec-pentilo, iso-pentilo, neopentilo, n-hexilo, sec-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-decilo, n-undecilo, dodecilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo y homólogos e isómeros de los mismos.

"Ramificado" se refiere a un grupo alquilo en el que un grupo alquilo inferior, tal como metilo, etilo o propilo, está unido a una cadena alquilo lineal. "Alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono (es decir, un alquilo C₁₋₈), por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 átomos de carbono. "Alquilo superior" se refiere a un grupo alquilo que tiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 átomos de carbono, por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 átomos de carbono. En ciertas realizaciones, "alquilo" se refiere, en particular, a alquilos C₁₋₈ de cadena lineal. En otras realizaciones, "alquilo" se refiere, en particular, a alquilos C₁₋₈ de cadena ramificada.

En ciertas realizaciones, los grupos alquilo son grupos alquilo C₁-C₆ o grupos alquilo C₁-C₄. El término "alquilo C₁-C₆", como se usa en el presente documento, significa hidrocarburos C₁-C₆ de cadena lineal, ramificados, o cíclicos que están completamente saturado e híbridos de los mismos, tal como (cicloalquil)alquilo. Los ejemplos de sustituyentes alquilo C₁-C₆ incluyen metilo (Me), etilo (Et), propilo (incluyendo n-propilo (n-Pr, ⁿPr), iso-propilo (i-Pr, ¹Pr), y ciclopropilo (c-Pr, ^oPr)), butilo (incluyendo n-butilo (n-Bu, ⁿBu), iso-butilo (i-Bu, ¹Bu), sec-butilo (s-Bu, ^sBu), *terc*-butilo (t-Bu, ¹Bu), o ciclobutilo (c-Bu, ^oBu)), etc.

Los grupos alquilo pueden sustituirse opcionalmente (un "alquilo sustituido") con uno o más sustituyentes de grupo alquilo, que pueden ser iguales o diferentes. El término "sustituyente del grupo alquilo" incluye alquilo, alquilo sustituido, halo, arilamino, acilo, hidroxilo, arioxilo, alcoxilo, alquiltio, ariltio, aralquiloxilo, aralquiltio, carboxilo, alcoxycarbonilo, oxo y cicloalquilo. Pueden insertarse opcionalmente a lo largo de la cadena alquilo uno o más átomos de oxígeno, azufre o de nitrógeno sustituido o sin sustituir, en la que el sustituyente de nitrógeno es hidrógeno, alquilo inferior (también denominado en el presente documento como "alquiloaminoalquilo") o arilo.

Por lo tanto, como se usa en el presente documento, el término "alquilo sustituido" incluye grupos alquilo, como se define en el presente documento, en los que uno o más átomos o grupos funcionales del grupo alquilo se reemplazan con otro átomo o grupo funcional, incluyendo, por ejemplo, alquilo, alquilo sustituido, halógeno, arilo, arilo sustituido, alcoxilo, hidroxilo, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, sulfato y mercapto.

El término "heteroalquilo", empleado en solitario o junto con otro término, significa, a menos que se indique de otra manera, un grupo hidrocarburo de cadena lineal o ramificada estable o cíclico o combinaciones de los mismos, que consiste en al menos un átomo de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O, N, P, Si y S, y en el que los átomos de nitrógeno, fósforo y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El heteroátomo o heteroátomos O, N, P y S y Si pueden colocarse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo, o en la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$, $\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, y $-\text{CN}$. Pueden ser consecutivos hasta dos o tres heteroátomos, tal como, por ejemplo, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ y $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$.

Como se ha descrito anteriormente, los grupos heteroalquilo, como se usa en el presente documento, incluyen aquellos grupos que están unidos al resto de la molécula a través de un heteroátomo, tal como $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}'$, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{OR}'$, $-\text{SR}$, y/o $-\text{SO}_2\text{R}'$. Cuando se cita un "heteroalquilo", seguido de referencias de grupos heteroalquilo específicos, tal como $-\text{NR}'\text{R}''$ o similares, deberá entenderse que dichos términos heteroalquilo y $-\text{NR}'\text{R}''$ no son redundantes o mutuamente excluyentes. Más bien, se hace referencia a grupos heteroalquilo específicos para añadir claridad. Por lo tanto, el término "heteroalquilo" no deberá interpretarse en el presente documento como exclusivo de determinados grupos heteroalquilo, tal como $-\text{NR}'\text{R}''$ o similares.

El término "(cicloalquil)alquilo", cicloalquilo, y alquilo son como se han definido anteriormente, y el punto de unión está en el grupo alquilo. Este término incluye, pero sin limitación, ciclopropilmetilo, ciclopentilmetilo, y ciclohexilmetilo. El grupo alquilo puede estar sustituido o sin sustituir.

"Cíclico" y "cicloalquilo" se refieren a un sistema anular no aromático mono o multicíclico de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, u 10 átomos de carbono. El grupo cicloalquilo puede estar opcionalmente parcialmente insaturado. El grupo cicloalquilo también puede estar opcionalmente sustituido con un sustituyente del grupo alquilo como se define en el presente documento, oxo, y/o alquilenos. Pueden insertarse opcionalmente a lo largo de la cadena de alquilo cíclico uno o más átomos de oxígeno, azufre o de nitrógeno sustituido o sin sustituir, en la que el sustituyente de nitrógeno es hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, arilo, o arilo sustituido, proporcionando así un grupo heterocíclico. Los anillos cicloalquilo monocíclicos representativos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo.

Los anillos cicloalquilo multicíclicos incluyen adamantilo, octahidronaftilo, decalina, alcanfor, canfano, y noradamantilo, y sistemas anulares condensados, tales como dihidro- y tetrahidronaftaleno.

Los términos "cicloheteroalquilo" o "heterocicloalquilo" se refieren a un sistema anular no aromático, un sistema anular insaturado o parcialmente insaturado, tal como un sistema anular cicloalquilo sustituido o sin sustituir de 3 a 10 miembros, incluyendo uno o más heteroátomos, que pueden ser iguales o diferentes, y se seleccionan del grupo que consiste en nitrógeno (N), oxígeno (O), azufre (S), fósforo (P), y silicio (Si), y opcionalmente pueden incluir uno o más dobles enlaces.

El anillo de cicloheteroalquilo se puede condensar opcionalmente o unirse a otros anillos de cicloheteroalquilo y/o anillos de hidrocarburo no aromático. Los anillos heterocíclicos incluyen aquellos que tienen de uno a tres heteroátomos seleccionados independientemente de oxígeno, azufre y nitrógeno, en los que los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden oxidarse opcionalmente y el heteroátomo de nitrógeno puede estar cuaternizado opcionalmente. En ciertas realizaciones, el término heterocíclico se refiere a un anillo no aromático de 5, 6 o 7 miembros o un grupo policíclico en el que al menos un átomo del anillo es un heteroátomo seleccionado de O, S y N (en el que los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados), incluyendo, un grupo bicíclico o tricíclico, que comprende anillos condensados de seis miembros que tienen entre uno y tres heteroátomos seleccionados independientemente del oxígeno, azufre y nitrógeno, en los que (i) cada anillo de 5 miembros tiene de 0 a 2 dobles enlaces, cada anillo de 6 miembros tiene de 0 a 2 dobles enlaces, y cada anillo de 7 miembros tiene de 0 a 3 dobles enlaces, (ii) los heteroátomos de nitrógeno y azufre puede estar opcionalmente oxidado, (iii) el heteroátomo nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado, y (iv) cualquiera de los anillos heterocíclicos

anteriores puede fusionarse a un anillo arilo o heteroarilo. Los sistemas anulares de cicloheteroalquilo representativos incluyen pirrolidinilo, pirrolinilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperidilo, piperazinilo, indolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, tiadiazinano, tetrahidrofuranilo.

5 Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", empleados en solitario o en combinación con otros términos, representan, a menos que se indique de otra manera, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Adicionalmente, para el heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo. Los ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero sin limitación, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofurano-2-ilo, tetrahidrofurano-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo. Los términos "cicloalquileno" y "heterocicloalquileno" se refieren a los derivados divalentes de cicloalquilo y heterocicloalquilo, respectivamente.

15 El término "cicloalquilalquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo cicloalquilo como se ha definido anteriormente en el presente documento, que está unido al resto molecular precursor a través de un grupo alquilo, también como se ha definido anteriormente. Los ejemplos de grupos cicloalquilalquilo incluyen ciclopropilmetilo y ciclopentilmetilo.

20 Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más dobles enlaces o triples enlaces. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butenilo, y los homólogos e isómeros superiores. Los grupos alquilo que están limitados a grupos hidrocarburo se denominan "homoalquilo".

25 Más particularmente, el término "alquenilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo monovalente derivado de un resto hidrocarburo C_{1-20} inclusive lineal o ramificado que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono mediante la eliminación de un solo átomo de hidrógeno. Los grupos alquenilo incluyen, por ejemplo, etenilo (es decir, vinilo), propenilo, butenilo, 1-metil-2-buten-1-ilo, pentenilo, hexenilo, octenilo, y butadienilo.

30 El término "cicloalquenilo" como se usa en el presente documento, se refiere a un hidrocarburo cíclico que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los ejemplos de grupos cicloalquenilo incluyen ciclopropenilo, ciclobutenilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo, ciclooctenilo.

35 El término "alquinilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo monovalente derivado de un hidrocarburo C_{1-20} lineal o ramificado de un número diseñado de átomos de carbono que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Los ejemplos de "alquinilo" incluyen grupos etinilo, 2-propinilo (propargilo), 1-propinilo, pentinilo, hexinilo, heptinilo y alenilo, y similares.

40 El término "alquileno" por sí mismo como una parte de otro sustituyente, se refiere a un grupo hidrocarburo alifático bivalente lineal o ramificado derivado de un grupo alquilo que tiene de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 átomos de carbono. El grupo alquileno puede ser lineal, ramificado o cíclico. El grupo alquileno también puede ser opcionalmente insaturado y/o sustituido con uno o más "sustituyentes de grupo alquilo". Puede insertarse opcionalmente a lo largo del grupo alquileno uno o más átomos de oxígeno, azufre o de nitrógeno sustituidos o sin sustituir (también denominados en el presente documento como "alquilaminoalquilo"), en el que el sustituyente de nitrógeno es alquilo como se ha descrito anteriormente. Los grupos alquileno ejemplares incluyen metileno ($-CH_2-$); etileno ($-CH_2-CH_2-$); propileno ($-(CH_2)_3-$); ciclohexileno ($-C_6H_{10}-$); $-CH=CH-CH=CH-$; $-CH=CH-CH_2-$; $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$, $-CH_2CH=CHCH_2-$, $-CH_2CsCCH_2-$, $-CH_2CH_2CH(CH_2CH_2CH_3)CH_2-$, $-(CH_2)_q-N(R)-(CH_2)_r-$, en el que cada uno de q y r es independientemente un número entero de 0 a aproximadamente 20, por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20, y R es hidrógeno o alquilo inferior; metilenodioxilo ($-O-CH_2-O-$); y etilenodioxilo ($-O-(CH_2)_2-O-$). Un grupo alquileno puede tener de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 átomos de carbono y puede tener además 6-20 carbonos. Típicamente, un grupo alquilo (o alquileno) tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, siendo aquellos grupos que tienen 10 átomos de carbono o menos algunas realizaciones de la presente divulgación. Un "alquilo inferior" o "alquileno inferior" es un grupo alquilo o alquileno de cadena más corta, que tiene generalmente ocho o menos átomos de carbono.

55 El término "heteroalquileno", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un grupo divalente procedente de heteroalquilo, como se ilustra, pero sin limitación, $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$ y $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$. Para los grupos heteroalquileno, los heteroátomos también pueden ocupar cualquiera o ambos de los extremos de la cadena (por ejemplo, alquilenooxo, alquilenodioxo, alquilenamino, alquilendiamino y similares). Aún adicionalmente, para los grupos de unión alquileno y heteroalquileno, la orientación del grupo de unión no está implícita en la dirección en la que se escribe la fórmula del grupo de unión. Por ejemplo, la fórmula $-C(O)OR'$ representa tanto $-C(O)OR'$ como $-R'OC(O)-$.

65 El término "arilo" significa, a menos que se indique de otra manera, un sustituyente de hidrocarburo aromático que puede ser un único anillo o múltiples anillos (tales como de 1 a 3 anillos), que están fusionados o unidos covalentemente.

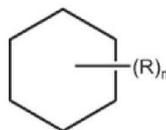
El término "heteroarilo" se refiere a grupos (o anillos) arilo que contienen de uno a cuatro heteroátomos (en cada anillo separado en el caso de múltiples anillos) seleccionados de N, O y S, en los que los átomos de nitrógeno y azufre están opcionalmente oxidados, y los átomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. Un grupo heteroarilo puede unirse al resto de la molécula a través de un carbono o heteroátomo. Los ejemplos de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-benzoimidazolilo, 5-indolilo, indazolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo y 6-quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas anulares arilo y heteroarilo indicados anteriormente se seleccionan entre el grupo de sustituyentes aceptables descritos a continuación. Los términos "arileno" y "heteroarileno" se refieren a las formas divalentes de arilo y heteroarilo, respectivamente.

Por razones de brevedad, el término "arilo", cuando se usa junto con otros términos (por ejemplo, ariloxo, ariltioxo, arilalquilo), incluye anillos tanto de arilo como de heteroarilo como se define anteriormente. Por lo tanto, el término "arilalquilo" y "heteroarilalquilo" pretenden incluir aquellos grupos en los que un grupo arilo o heteroarilo está unido a un grupo alquilo (por ejemplo, bencilo, fenetilo, piridilmetilo, furilmetilo), incluyendo aquellos grupos alquilo en los que un átomo de carbono (por ejemplo, un grupo metileno) se ha reemplazado por, por ejemplo, un átomo de oxígeno (por ejemplo, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo y similares). El término "haloarilo", sin embargo, como se usa en el presente documento, pretende incluir solo arilos sustituidos con uno o más halógenos.

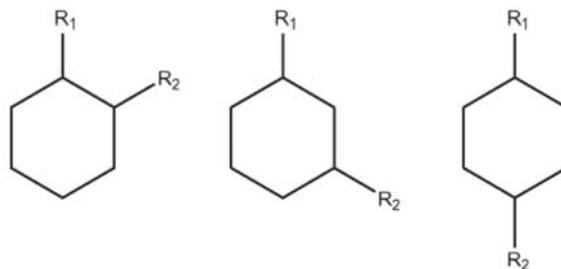
Cuando un heteroalquilo, heterocicloalquilo o heteroarilo incluye un número específico de miembros (por ejemplo, "de 3 a 7 miembros"), el término "miembro" se refiere a un carbono o heteroátomo.

Como se usa en el presente documento, el término "alquilarilo" incluye grupos alquilo, como se define anteriormente, sustituidos por grupos arilo, como se define anteriormente. El grupo arilo puede estar conectado en cualquier punto en el grupo alquilo. El término alquilarilo C₄-C₁₆ incluye grupos alquilarilo que tienen un total de 4 a 16 átomos de carbono, contando los átomos de carbono en el grupo alquilo y el grupo arilo juntos. Los ejemplos de grupos alquilarilo incluyen, pero sin limitación, bencilo (fenilmetilo), feniletilo y naftilmetilo. El grupo alquilarilo puede estar sustituido o sin sustituir. Los sustituyentes no se cuentan para el número total de átomos en el grupo alquilarilo, siempre que los átomos totales en el sustituyente o sustituyentes no sean mayores que el grupo alquilarilo.

Además, una estructura representada generalmente por la fórmula:

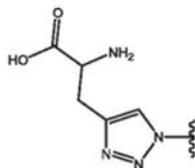


como se usa en el presente documento, se refiere a una estructura anular, por ejemplo, un compuesto cíclico alifático y/o aromático de 3 carbonos, 4 carbonos, 5 carbonos, 6 carbonos, 7 carbonos, que incluye una estructura anular saturada, una estructura anular parcialmente saturada, y una estructura anular insaturada, que comprende un grupo sustituyente R, en el que el grupo R puede estar presente o ausente, y cuando está presente, uno o más grupos R pueden estar sustituidos en uno o más átomos de carbono disponibles del estructura anular. La presencia o ausencia del grupo R y el número de grupos R se determina por el valor de la variable "n", que es un número entero que generalmente tiene un valor que varía de 0 al número de átomos de carbono en el anillo disponible para la sustitución. Cada grupo R, si hay más de uno, está sustituido en un carbono disponible de la estructura anular en lugar de en otro grupo R. Por ejemplo, la estructura anterior, donde n es de 0 a 2 comprenderá grupos de compuestos que incluyen:



Una línea discontinua que representa un enlace en una estructura anular cíclica indica que el enlace puede estar presente o ausente en el anillo. Es decir, una línea discontinua que representa un enlace en una estructura anular cíclica indica que la estructura anular se selecciona del grupo que consiste en una estructura anular saturada, una estructura anular parcialmente saturada, y una estructura anular insaturada.

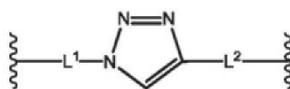
Un sustituyente que lleva un enlace roto, tal como el ejemplo que se muestra a continuación, significa que el sustituyente está directamente unido a la molécula en la posición indicada. Se no implican grupos metileno (CH₂) adicionales. El símbolo (~~~~~) representa el punto de unión de un resto al resto de la molécula.



5

Los sustituyentes que tienen dos enlaces rotos, tal como el ejemplo que se muestra a continuación, significa que la orientación de los átomos es como se indica, de izquierda a derecha y debe insertarse en una molécula en la orientación que se muestra. No se implican grupos de metileno (CH₂) adicionales, a menos que se indique específicamente.

10



15 Cuando un átomo nombrado de un anillo aromático o un anillo aromático heterocíclico se define como "ausente", el átomo nombrado se reemplaza por un enlace directo.

Cada uno de los términos anteriores (por ejemplo, "alquilo", "heteroalquilo", "cicloalquilo, y "heterocicloalquilo", "arilo", "heteroarilo", "fosfonato", y "sulfonato", así como sus derivados divalentes), pretenden incluir tanto formas sustituidas como sin sustituir del grupo indicado. A continuación se proporcionan sustituyentes opcionales para cada tipo de grupo.

20

Los sustituyentes para grupos derivados de alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo monovalentes y divalentes (incluidos aquellos grupos a menudo denominados alquilenos, alquilenos, heteroalquilenos, heteroalquilenos, alquilenos, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquilenos y heterocicloalquilenos) pueden ser uno o más de una diversidad de grupos seleccionados de, pero sin limitación: -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -C(O)NR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NR'-C(O)NR'R'', -NR'C(O)OR', -NR-C(NR'R'')=NR''', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NRSO₂R', -CN y -NO₂ en un número que varía de cero a (2m'+1), donde m' es el número total de átomos de carbono en dichos grupos. R', R'', R''' y R'''' pueden referirse cada uno independientemente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir (por ejemplo, arilo sustituido con 1-3 halógenos), alquilo sustituido o sin sustituir, grupos alcoxi o tioalcoxi, o grupos arilalquilo. Como se usa en el presente documento, un grupo "alcoxi" es un alquilo unido al resto de la molécula a través de un oxígeno divalente. Cuando un compuesto de la divulgación incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como un grupo R', R'', R''' y R'''' cuando está presente más de uno de estos grupos. Cuando R' y R'' se unen al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 4, 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R'' pretende incluir 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. Del anterior análisis de los sustituyentes, un experto en la técnica comprenderá que el término "alquilo" pretende incluir grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos diferentes de los grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (por ejemplo, -CF₃ y -CH₂CF₃) y acilo (por ejemplo, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃).

25

30

35

40 De manera similar a los sustituyentes descritos para los grupos alquilo anteriores, los sustituyentes ejemplares para los grupos arilo y heteroarilo (así como sus derivados divalentes) varían y se seleccionan de, por ejemplo: halógeno, -OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -C(O)NR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NR'-C(O)NR'R'', -NR'C(O)OR', -NR-C(NR'R'')=NR''', -NR-C(NR'R'')=NR'''-S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NRSO₂R', -CN y -NO₂, -R', -N₃, -CH(Ph)₂, fluoroalcoxi (C₁-C₄), y fluoroalquilo (C₁-C₄), en un número que varía de cero al número total de valencias abiertas en el sistema anular aromático; y donde R', R'', R''' y R'''' pueden seleccionarse independientemente de hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, y heteroarilo sustituido o sin sustituir. Cuando un compuesto de la divulgación incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como un grupo R', R'', R''' y R'''' cuando está presente más de uno de estos grupos.

50

Dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden formar opcionalmente un anillo de la fórmula -T-C(O)-(CRR')_q-U-, en la que T y U son independientemente -NR-, -O-, -CRR'- o un enlace sencillo, y q es un número entero de 0 a 3. Como alternativa, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente por un sustituyente de la fórmula -A-(CH₂)_r-B-, en la que A y B son independientemente -CRR'-, -O-, -NR-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)₂NR'- o un enlace sencillo, y r es un número entero de 1 a 4.

55

Uno de los enlaces simples del nuevo anillo así formado puede reemplazarse opcionalmente por un doble enlace. Como alternativa, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente por un sustituyente de la fórmula $-(CRR')_s-X'$ ($C(R'')_d$), donde s y d son independientemente números enteros de 0 a 3, y X' es -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, o -S(O)₂NR'-. Los sustituyentes R, R', R'' y R''' pueden seleccionarse independientemente de hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir y heteroarilo sustituido o sin sustituir.

Como se usa en el presente documento, el término "acilo" se refiere a un grupo de ácido orgánico en el que el -OH del grupo carboxilo se ha reemplazado por otro sustituyente y tiene la fórmula general RC(=O)-, en la que R es un grupo alquilo, alquenoilo, alquinoilo, arilo, carbocíclico, heterocíclico, o heterocíclico aromático como se define en el presente documento). Como tal, el término "acilo" incluye específicamente grupos arilacilo, tal como un grupo acetilfurano y un grupo fenacilo. Ejemplos específicos de grupos acilo incluyen acetilo y benzoílo.

Los términos "alcoxilo" o "alcoxi" se usan de forma intercambiable en el presente documento y se refieren a un grupo saturado (es decir, alquil-O-) o insaturado (es decir, alquenoil-O- y alquinoil-O-) unido al resto molecular precursor a través de un átomo de oxígeno, en el que los términos "alquilo", "alquenoilo", y "alquinoilo" son como se han descrito previamente y pueden incluir cadenas oxo-hidrocarburo C₁₋₂₀ inclusive, lineales, ramificadas o cíclicas, saturadas o insaturadas, incluyendo, por ejemplo, metoxilo, etoxilo, propoxilo, isopropoxilo, n-butoxilo, sec-butoxilo, t-butoxilo, y n-pentoxilo, neopentoxilo, n-hexoxilo.

El término "alcoxialquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un alquil-O-alquil éter, por ejemplo, un grupo metoxietilo o un grupo etoximetilo.

"Arioxi" se refiere a un grupo aril-O-, en el que el grupo arilo es como se ha descrito previamente, incluyendo un arilo sustituido. El término "ariloxilo", como se usa en el presente documento, puede referirse a feniloxilo o hexiloxilo, y alquilo, alquilo sustituido, halo, o feniloxilo o hexiloxilo sustituidos con alcoxilo.

"Aralquilo" se refiere a un grupo aril-alquilo en el que arilo y alquilo son como se han descrito previamente, e incluyen arilo sustituido y alquilo sustituido. Los grupos aralquilo ejemplares incluyen bencilo, feniletilo, y naftilmetilo.

"Aralquioxilo" se refiere a un grupo aralquil-O- en el que el grupo aralquilo es como se ha descrito previamente. Un grupo aralquioxilo ejemplar es benciloxilo.

"Alcoxicarbonilo" se refiere a un grupo alquil-O-CO-. Los grupos alcoxicarbonilo ejemplares incluyen metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, butiloxicarbonilo, y t-butiloxicarbonilo.

"Ariloxicarbonilo" se refiere a un grupo aril-O-CO-. Los grupos ariloxicarbonilo ejemplares incluyen fenoxi- y naftoxi-carbonilo.

"Aralcoxicarbonilo" se refiere a un grupo aralquil-O-CO-. Un grupo aralcoxicarbonilo ejemplar es benciloxicarbonilo.

"Carbamoílo" se refiere a un grupo amida de la fórmula -CONH₂. "Alquilcarbamoílo" se refiere a un grupo R'RN-CO- en el que uno de R y R' es hidrógeno y el otro de R y R' es alquilo y/o alquilo sustituido como se ha descrito previamente. "Dialquilcarbamoílo" se refiere a un grupo R'RN-CO- en el que cada uno de R y R' es independientemente alquilo y/o alquilo sustituido como se ha descrito previamente.

El término carbonildioxilo, como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo carbonato de la fórmula -O-CO-OR.

"Aciloxilo" se refiere a un grupo acil-O-, en el que acilo es como se ha descrito previamente.

El término "amino" se refiere al grupo -NH₂ y también se refiere a un grupo que contiene nitrógeno como se conoce en la técnica derivado de amonio por el reemplazo de uno o más radicales hidrógeno por radicales orgánicos. Por ejemplo, los términos "acilamino" y "alquilamino" se refieren a radicales orgánicos N-sustituidos específicos con grupos sustituyentes acilo y alquilo respectivamente.

Un "aminoalquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo amino unido covalentemente a un enlazador alquilo. Más particularmente, los términos alquilamino, dialquilamino, y trialquilamino, como se usan en el presente documento, se refieren a uno, dos, o tres, respectivamente, grupos alquilo, como se define previamente, unidos al resto molecular precursor a través de un átomo de nitrógeno. El término alquilamino se refiere a un grupo que tiene la estructura -NHR' en la que R' es un grupo alquilo, como se define previamente; mientras que el término dialquilamino se refiere a un grupo que tiene la estructura -NR'R'', en la que R' y R'' se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en grupos alquilo. El término trialquilamino se refiere a un grupo que tiene la estructura -NR'R''R''', en la que R', R' y R''' se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en grupos alquilo. Adicionalmente, R', R'', y/o R''' tomados juntos pueden ser opcionalmente -(CH₂)_k-, donde k es un número entero de 2 a 6. Los ejemplos incluyen metilamino, dimetilamino, etilamino, dietilamino, dietilaminocarbonilo,

metiletilamino, iso-propilamino, piperidino, trimetilamino, y propilamino.

El grupo amino es $-NR'R''$, en la que R' y R'' se seleccionan típicamente de hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, heteroalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, o heteroarilo sustituido o sin sustituir.

Los términos alquiltioeter y tioalcoxilo se refieren a un grupo saturado (es decir, alquil-S-) o insaturado (es decir, alquénil-S- y alquínil-S-) unido al resto molecular precursor a través de un átomo de azufre. Los ejemplos de restos tioalcoxilo incluyen metiltio, etiltio, propiltio, isopropiltio, n-butiltio, y similares.

"Acilamino" se refiere a un grupo acil-NH- en el que acilo es como se ha descrito previamente. "Aroilamino" se refiere a un grupo aroil-NH- en el que aroilo es como se ha descrito previamente.

El término "carbonilo" se refiere al grupo $-(C=O)-$.

El término "carboxilo" se refiere al grupo $-COOH$. Dichos grupos también se denominan en el presente documento como un resto de "ácido carboxílico".

Los términos "halo", "haluro", o "halógeno", como se usan en el presente documento, se refieren a flúor, cloro, bromo, y yodo. Adicionalmente, términos tales como "haloalquilo", pretenden incluir monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, el término "haloalquilo (C₁-C₄)" pretende incluir trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo, 3-bromopropilo.

El término "hidroxi" se refiere a un grupo $-OH$.

El término "hidroxialquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo $-OH$.

El término "mercapto" se refiere al grupo $-SH$.

El término "oxo", como se usa en el presente documento, significa un átomo de oxígeno que está unido mediante un doble enlace a un átomo de carbono o a otro elemento.

El término "nitro" se refiere al grupo $-NO_2$.

El término "tio" se refiere a un compuesto descrito previamente en el presente documento, en el que un átomo de carbono u oxígeno se reemplaza por un átomo de azufre.

El término "sulfato" se refiere al grupo $-SO_4$.

El término tiohidroxilo o tiol, como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de la fórmula $-SH$.

El término ureido se refiere a un grupo urea de la fórmula $-NH-CO-NH_2$.

A menos que se define explícitamente de otro modo, un "grupo de sustituyentes", como se usa en el presente documento, incluye un grupo funcional seleccionado de uno o más de los siguientes restos, que se definen en el presente documento:

(A) $-OH$, $-NH_2$, $-SH$, $-CN$, $-CF_3$, $-NO_2$, oxo, halógeno, alquilo sin sustituir, heteroarilo sin sustituir, cicloalquilo sin sustituir, heterocicloalquilo sin sustituir, arilo sin sustituir, heteroarilo sin sustituir y

(B) alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de:

(i) oxo, $-OH$, $-NH_2$, $-SH$, $-CN$, $-CF_3$, $-NO_2$, halógeno, alquilo sin sustituir, heteroarilo sin sustituir, cicloalquilo sin sustituir, heterocicloalquilo sin sustituir, arilo sin sustituir, heteroarilo sin sustituir y

(ii) alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo y heteroarilo, sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de:

(a) oxo, $-OH$, $-NH_2$, $-SH$, $-CN$, $-CF_3$, $-NO_2$, halógeno, alquilo sin sustituir, heteroarilo sin sustituir, cicloalquilo sin sustituir, heterocicloalquilo sin sustituir, arilo sin sustituir, heteroarilo sin sustituir y

(b) alquilo, heteroalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, arilo o heteroarilo, sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de oxo, $-OH$, $-NH_2$, $-SH$, $-CN$, $-CF_3$, $-NO_2$, halógeno, alquilo sin sustituir, heteroarilo sin sustituir, cicloalquilo sin sustituir, heterocicloalquilo sin sustituir, arilo sin sustituir y heteroarilo sin sustituir.

Un "sustituyente inferior" o "grupo sustituyente inferior", como se usa en el presente documento, significa un grupo seleccionado de todos los sustituyentes descritos anteriormente en el presente documento para un "grupo

sustituyente", en el que cada alquilo sustituido o sin sustituir es un alquilo C₁-C₈ sustituido o sin sustituir, cada heteroalquilo sustituido o sin sustituir es un heteroalquilo de 2 a 8 miembros sustituido o sin sustituir, cada cicloalquilo sustituido o sin sustituir es un cicloalquilo C₅-C₇ sustituido o sin sustituir, y cada heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir es un heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir de 5 a 7 miembros.

5 Un "sustituyente de tamaño limitado" o "grupo sustituyente de tamaño limitado", como se usa en el presente documento, significa un grupo seleccionado de todos los sustituyentes descritos anteriormente para un "grupo sustituyente", en el que cada alquilo sustituido o sin sustituir es un alquilo C₁-C₂₀ sustituido o sin sustituir, cada heteroalquilo sustituido o sin sustituir es un heteroalquilo de 2 a 20 miembros sustituido o sin sustituir, cada cicloalquilo sustituido o sin sustituir es un cicloalquilo C₄-C₈ sustituido o sin sustituir, y cada heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir es un heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir de 4 a 8 miembros.

10 A lo largo de toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, una fórmula o nombre químico dado abarcará todos los tautómeros, congéneres y estereoisómeros ópticos y ópticos, así como las mezclas racémicas donde existan tales isómeros y mezclas.

15 Será evidente para un experto en la técnica que determinados compuestos de esta divulgación pueden existir en formas tautoméricas, todas estas formas tautoméricas de los compuestos que están dentro del alcance de la divulgación. El término "tautómero", como se usa en el presente documento, se refiere a uno o dos o más isómeros estructurales que existen en equilibrio y que puede convertirse fácilmente de una forma isomérica a otra.

20 A menos que se indique de otro modo, las estructuras representadas en el presente documento también pretenden incluir todas las formas estereoquímicas de la estructura; es decir, las configuraciones R y S para cada centro asimétrico. Por lo tanto, los isómeros estereoquímicos individuales, así como mezclas enantioméricas y diastereoméricas de los compuestos precursores, están dentro del alcance de la divulgación.

25 Determinados compuestos de la presente divulgación poseen átomos de carbono asimétricos (centros ópticos o centros quirales) o dobles enlaces; los enantiómeros, racematos, diastereómeros, tautómeros, isómeros geométricos, formas estereoisoméricas que pueden definirse, en términos de estereoquímica absoluta, como (R) o (S) o, como (D) o (L) para aminoácidos, y los isómeros individuales están abarcados en el alcance de la presente divulgación. Los compuestos de la presente divulgación no incluyen aquellos que son conocidos en la técnica por ser demasiado inestables para sintetizarlos y/o aislarlos. La presente divulgación pretende incluir compuestos en formas racémicas y ópticamente puras. Pueden prepararse isómeros (R) y (S) o (D) y (L) ópticamente activos usando sintones quirales o reactivos quirales, o resolverse usando técnicas convencionales. Cuando los compuestos descritos en el presente documento contienen enlaces olefínicos u otros centros de asimetría geométrica, y a menos que se especifique otra cosa, se entiende que los compuestos incluyen los isómeros geométricos E y Z.

30 En la técnica se sabe bien 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 métodos convencionales tales como cristalización en presencia de un agente de resolución o cromatografía, usando, por ejemplo, una columna de HPLC quiral. Muchos isómeros geométricos de las olefinas, C=N dobles enlaces, y similares, también pueden estar presentes en los compuestos descritos en el presente documento, y todos estos isómeros estables se contemplan en la materia objeto divulgada actualmente. Los isómeros cis y trans geométricos de los compuestos de la materia objeto divulgada actualmente se describen y pueden aislarse como una mezcla de isómeros o como formas isoméricas separadas. Se prevén todas las formas quirales (enantioméricas y diastereoméricas) y racémicas, así como todas las formas isoméricas geométricas de una estructura, a menos que se indique específicamente la forma estereoquímica o isomérica específica.

35 40 45 50 Los compuestos descritos en el presente documento pueden tener uno o más átomos cargados. Por ejemplo, los compuestos pueden ser zwitteriónicos, pero pueden ser neutros en general. Otras realizaciones pueden tener uno o más grupos cargados, dependiendo del pH y otros factores. En estas realizaciones, el compuesto puede estar asociado con un contraión adecuado. Es bien conocido en la técnica cómo preparar sales o intercambiar contraiones. Generalmente, dichas sales pueden prepararse haciendo reaccionar formas de ácido libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada (tal como, hidróxido, carbonato, bicarbonato de Na, Ca, Mg, o K, o similares), o haciendo reaccionar las formas de base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Dichas reacciones se realizan normalmente en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos. Los contraiones pueden cambiarse, por ejemplo, mediante técnicas de intercambio iónico tal como cromatografía de intercambio iónico. Se prevén todos los zwitteriones, sales y contraiones, a menos que el contraión o la sal estén específicamente indicados. En ciertas realizaciones, la sal o el contraión pueden ser farmacéuticamente aceptables, para su administración a un sujeto. Las sales farmacéuticamente aceptables se analizan más adelante.

55 60 65 Como se usa en el presente documento, un "grupo protector" es un sustituyente químico que puede eliminarse selectivamente por reactivos fácilmente disponibles que no atacan al grupo funcional regenerado u otros grupos funcionales en la molécula. Los grupos protectores adecuados se conocen en la técnica y continúan desarrollándose. Se pueden encontrar grupos protectores adecuados, por ejemplo, en Wutz et al. ("Greene's Protective Groups in

Organic Synthesis, Cuarta Edición", Wiley-Interscience, 2007). Se usan grupos protectores para la protección del grupo carboxilo, como se describe por Wutz et al. (páginas 533-643), en ciertas realizaciones. En algunas realizaciones, el grupo protector se puede eliminar mediante tratamiento con ácido. Los ejemplos específicos de grupos protectores incluyen, pero sin limitación, bencilo, p-metoxibencilo (PMB), butilo terciario (^tBu), metoximetilo (MOM), metoxietoximetilo (MEM), metiltiommetilo (MTM), tetrahidropirranilo (THP), tetrahidrofuranilo ("THF"), benciloximetilo (BOM), trimetilsililo (TMS), trietilsililo (TES), t-butildimetilsililo (TBDMS), y trifenilmetilo (trilito, Tr). Los expertos en la técnica reconocerán situaciones apropiadas en las que se requieren grupos protectores y podrán seleccionar un grupo protector apropiado para su uso en una circunstancia particular.

10 A menos que se indique de otro modo, las estructuras representadas en el presente documento también pretenden incluir compuestos que difieren solamente en presencia de uno más átomos enriquecidos isotópicamente. Por ejemplo, los compuestos que tienen las presentes estructuras, excepto por el reemplazo de un hidrógeno por deuterio o tritio, o el reemplazo de un carbono por un carbono enriquecido con ¹³C o ¹⁴C, están dentro del alcance de esta divulgación.

15 Los compuestos de la presente divulgación también pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos que constituyen dichos compuestos. Por ejemplo, los compuestos pueden radiomarcarse con isótopos radioactivos, tales como, por ejemplo, (³H), yodo-125 (¹²⁵I) o carbono-14 (¹⁴C). Todas las variaciones isotópicas de los compuestos de la presente divulgación, ya sean radioactivas o no, están incluidas dentro del alcance de la presente divulgación.

20

ii. Sales farmacéuticas

Los compuestos de la presente divulgación pueden existir en la forma de sales farmacéuticamente aceptables. El término "sales farmacéuticamente aceptables" pretende incluir las sales de los compuestos activos que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los restos de sustituyentes particulares que se encuentran en los compuestos descritos en el presente documento. Las sales farmacéuticamente aceptables son generalmente bien conocidas por los expertos en la técnica, y pueden incluir, a modo de ejemplo, acetato, bencenosulfonato, besilato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato de calcio, carnisilato, carbonato, citrato, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, bromhidrato, clorhidrato, hidroxinaftoato, yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, mucato, napsilato, nitrato, pamoato (embonato), pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tartratos, (por ejemplo, (+)-tartratos, (-)-tartratos o mezcla de los mismos que incluyen mezclas racémicas), o teocato. Estas sales pueden prepararse por métodos conocidos para los expertos en la técnica. Se pueden encontrar otras sales farmacéuticamente aceptables en, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20^a ed.) Lippincott, Williams & Wilkins (2000).

También se incluyen sales de adición de bases tales como sal de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico o sal de magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos de la presente divulgación contienen funcionalidades relativamente básicas, pueden obtenerse sales de adición de ácidos poniendo en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, pura o en un disolvente inerte adecuado. Ejemplos de sales de adición de ácidos aceptables incluyen las procedentes de ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico, o fosforoso y similares, así como las sales obtenidas a partir de ácidos orgánicos como acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico.

También se incluyen sales de aminoácidos, tales como arginato, y sales de ácidos orgánicos como ácidos glucurónico o galactunónico y similares, véase, por ejemplo, Berge et al, "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19). Determinados compuestos específicos de la presente divulgación contienen funcionalidades tanto básicas como ácidas que permiten que los compuestos se conviertan en sales de adición de bases o de ácidos. Las formas neutras de los compuestos pueden regenerarse poniendo en contacto la sal con una base o un ácido y aislando el compuesto precursor de la manera convencional. La forma precursora del compuesto difiere de las diversas formas de sal en determinadas propiedades físicas, tales como la solubilidad en disolventes polares.

Determinados compuestos de la presente divulgación pueden existir en formas no solvatadas así como en formas solvatadas, incluyendo formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y están incluidas dentro del alcance de la presente divulgación. Determinados compuestos de la presente divulgación pueden existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados en la presente divulgación y pretenden estar dentro del alcance de la presente divulgación.

iii. Definiciones generales

Aunque se emplean en el presente documento términos específicos, estos se usan únicamente en un sentido genérico y descriptivo y no con fines limitativos. Se proporcionan definiciones particulares en el presente documento para mayor claridad. Salvo que se defina de otra forma, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento

tienen el mismo significado que comúnmente se comprende por parte del experto en la técnica a la que pertenece la materia objeto descrita actualmente.

5 Un "cáncer" en un animal se refiere a la presencia de células que poseen características típicas de las células que causan cáncer, por ejemplo, proliferación descontrolada, pérdida de funciones especializadas, inmortalidad, potencial metastásico significativo, aumento significativo de la actividad antiapoptótica, rápida tasa de crecimiento y proliferación, y cierta morfología característica y marcadores celulares. En algunas circunstancias, las células cancerosas tendrán la forma de un tumor; dichas células pueden existir localmente dentro de un animal, o circular en el torrente sanguíneo como células independientes.

10 Por "control" se entiende una condición estándar o de referencia.

15 Por "enfermedad" se entiende cualquier afección o trastorno que dañe o interfiera con la función normal de una célula, tejido, órgano, organismo o sujeto.

20 Una "cantidad eficaz" de un agente se refiere a la cantidad del agente suficiente para provocar una respuesta biológica deseada o una diferencia medible en comparación con un control. Como entenderá el experto en la técnica, la cantidad absoluta de un agente particular que es eficaz para tratar una enfermedad, trastorno, afección o lesión puede variar dependiendo de factores tales como el agente a administrar, la forma de administración, la edad, el peso corporal y la salud general del sujeto, el criterio de valoración biológico deseado, el efecto terapéutico deseado y similares. En la última instancia, un médico tratante decidirá la cantidad y el régimen de dosificación apropiados. Por ejemplo, una "cantidad eficaz" de un agente puede ser una cantidad suficiente para producir una imagen medible cuando el compuesto se usa para obtener imágenes, o una cantidad suficiente para mejorar los síntomas de una enfermedad cuando el compuesto se usa para terapia. Un experto en la técnica comprenderá además que una cantidad eficaz de un agente puede administrarse en una dosis única, o puede lograrse mediante la administración de dosis múltiples.

25 El término "administrar", como se usa en el presente documento, se refiere a poner en contacto un sujeto con un agente divulgado actualmente.

30 Siguiendo una antigua convención de derecho de patentes, los términos "un", "una", y "el/la" se refieren a "uno o más" cuando se usan en esta solicitud, incluidas las reivindicaciones. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un sujeto" incluye una pluralidad de sujetos, a menos que el contexto sea claramente lo contrario (por ejemplo, una pluralidad de sujetos), etc.

35 A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, los términos "comprender", "comprende", y "que comprende" se usan en un sentido no exclusivo, excepto cuando el contexto requiera lo contrario. Asimismo, el término "incluir" y sus variantes gramaticales están destinados a ser no limitativos, de tal forma que la mención de elementos en una lista no excluye otros elementos similares que pueden sustituirse o añadirse a los elementos enumerados.

40 A los efectos de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones adjuntas, a menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades, tamaños, dimensiones, proporciones, formas, formulaciones, parámetros, porcentajes, parámetros, cantidades, características y otros valores numéricos utilizados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente", aunque el término "aproximadamente" puede no aparecer expresamente con el valor, cantidad o rango. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la siguiente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas no son ni necesitan ser exactos, pero pueden ser aproximados y/o más grandes o más pequeños según se desee, lo que refleja tolerancias, factores de conversión, redondeo, error de medición y similares, y otros factores conocidos por los expertos en la técnica dependiendo de las propiedades deseadas que se buscan obtener por la materia objeto divulgada actualmente. Por ejemplo, el término "aproximadamente", cuando se refiere a un valor puede pretender incluir variaciones de, en algunas realizaciones, $\pm 100\%$ en algunas realizaciones $\pm 50\%$, en algunas realizaciones $\pm 20\%$, en algunas realizaciones $\pm 10\%$, en algunas realizaciones $\pm 5\%$, en algunas realizaciones $\pm 1\%$, en algunas realizaciones $\pm 0,5\%$, y en algunas realizaciones $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos divulgados o emplear las composiciones divulgadas.

55 Además, el término "aproximadamente", cuando se usa en relación con uno o más números o rangos numéricos, debe entenderse que se refiere a todos esos números, incluidos todos los números en un rango, y modifica ese rango extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos expuestos. La enumeración de rangos numéricos por criterios de valoración incluye todos los números, por ejemplo, números enteros, incluidas las fracciones de los mismos, incluyendo dentro de ese rango (por ejemplo, la mención de 1 a 5 incluye 1, 2, 3, 4 y 5, así como fracciones de los mismos, por ejemplo, 1,5, 2,25, 3,75, 4,1, y similares) y cualquier rango dentro de ese rango.

Ejemplos

65 Los siguientes Ejemplos se han incluido para proporcionar orientación a un experto en la técnica para poner en práctica realizaciones representativas de la materia objeto divulgada actualmente.

EJEMPLO 1

Síntesis y evaluación de los agentes de contraste basados en gadolinio (Gd)

5 La obtención de imágenes por resonancia magnética (RM) es ventajosa porque puede proporcionar información anatómica, funcional y molecular al mismo tiempo. La imagen por RM molecular puede combinar la ubicuidad de esta modalidad clínica establecida y su alta resolución espacial con el perfil molecular *in vivo*. Sin embargo, debido a la sensibilidad intrínsecamente baja de la RM, se requieren altas concentraciones locales de objetivos biológicos para generar un contraste discernible de RM. Se presume que el antígeno prostático específico de membrana (PSMA), un objetivo atractivo para la obtención de imágenes y la terapia del cáncer de próstata, podría servir como un biomarcador adecuado para la obtención de imágenes moleculares por RM debido a su alta concentración dentro de las células objetivo, la expresión limitada en tejidos objetivo y la accesibilidad en la superficie celular. Para este fin, se han sintetizado tres agentes de contraste dirigidos a PSMA basados en gadolinio (Gd) (III) de alta afinidad y bajo peso molecular clasificados con uno a tres quelatos de Gd por molécula **Gd1** (Ejemplo de referencia), **Gd2** y **Gd3**, respectivamente (figura 1A). El objetivo de este estudio fue evaluar las afinidades de unión a PSMA y la relajación longitudinal (r_1) de los agentes sintetizados. La captación celular de los agentes en células que expresan PSMA y células de control sin expresión isogénicas, se evaluó usando espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Finalmente, la capacidad de los agentes para distinguir las células que expresan PSMA de las células de control se evaluó tanto *in vitro* como *in vivo* mediante imágenes por RM.

Materiales y métodos

25 **Ácido (21S,25S)-8,15,23-trioxo-1-((4-((1,4,7,10-tetraquis(carboximetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-2-il)metil)fenil)amino)-1-tioxo-2,7,16,22,24-pentaazaheptacosano-21,25,27-tricarboxílico, Gd1 (Ejemplo de referencia).** El compuesto Gd1 (Ejemplo de referencia) se preparó siguiendo un informe reciente. El compuesto 1 se preparó en tres etapas como se describe a continuación. N-Boc-1,4 diaminobutano disponible comercialmente (68 mg, 0,36 mmol en 0,5 ml de DMSO) se mezcló con ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacético, 2-[[4-isotiocianatofenil)metilo] (p-SCN- Bn-DOTA) (192 mg, 0,28 mmol en 2,5 ml de DMSO) y DIEA (132 μ l, 0,75 mmol) y se agitó a 40 °C durante 4 h. El disolvente se evaporó y el residuo sólido se purificó por cromatografía ultrarrápida C₁₈ de fase inversa (5,5 g, Agilent SF10) usando agua y acetonitrilo (TFA al 0,1 % cada vez) para obtener 7 Boc-prottegido después de la liofilización. Rendimiento: 146 mg, ~55 %. ESI-MS 740 [M+H]⁺. El compuesto resultante de esta etapa se trató entonces con una solución enfriada con hielo de TFA/CH₂Cl₂ (1/1) y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. El disolvente se evaporó y el residuo se secó al vacío y se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (5,5 g, Agilent SF10) para producir 7 con un rendimiento moderado. El disolvente se evaporó y el residuo se secó al vacío y se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (5,5 g, Agilent SF10) para producir 7. Rendimiento ~104 mg, 40 %. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ : 8,80-8,64 (m, 1H), 8,12-7,90 (m, 2H), 7,75-7,10 (m a, 4H), 4,65-4,63 (m, 1H), 4,17-2,59 (m, 27H), 2,40-1,11 (m, 6H). ESI-MS: 640 [M+1]⁺. Una solución de 7 (110 mg, 0,17 mmol en 3 ml agua destilada) se añadió a una solución de Gd₂(CO₃)₃ (85 mg, 0,17 mmol) y se dejó en agitación a 60 °C durante 14 h. ESI-MS: Calc. para C₄₈H₇₇N₁₀O₁₇S, 797,5183 [M+H]⁺, observado: 797,5212. Después, el compuesto se purificó por HPLC. **Método 1:** Disolvente A (TFA al 0,1 % en agua) y disolvente B (TFA al 0,1 % en acetonitrilo), caudal 8 ml/min. El gradiente de elución fue del 100 % de A y el 0 % de B durante 5 min y del 100 % de A al 80 % de A y del 0 % de B al 20 % de B durante 5 - 25 min, y del 80 % de A al 20 % de A y del 20 % de B al 80 % de B durante 25-30 min.

45 **Ácido (30S,34S)-2,9,17,24,32-pentaoxo-1-(4,7,10-tris(carboximetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1-il)-8-(2-(4,7,10-tris(carboximetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1-il)acetamido)-3,10,16,25,31,33-hexaazahexatriacontan-11,30,34,36-tetracarboxílico, sal de digadolinio (III). Gd2.** El compuesto se preparó siguiendo el **Esquema 2**. A una solución de N-Bis-Boc-L-Lisina NHS (3 gm, 6,7 mmol en 10 ml de DMF) se le añadió Fmoc-Lys(Boc)-OH (2,49 g, 6,7 mmol) y la solución se sometió a sonicación a ta durante 1 h hasta que se obtuvo una solución transparente. Después, la solución se agitó durante 4 h a ta y el disolvente se retiró al vacío para obtener 4 con un rendimiento casi cuantitativo. El compuesto 4 se purificó adicionalmente por columna sobre gel de sílice usando 3/97 de MeOH/CH₂Cl₂ como eluyente). ¹H RMN (CDCl₃) δ : 8,01 (d, 2H), 7,89 (m, 2H), 7,78-7,44 (m, 4H), 6,82(m, 1H), 6,15(m, 1H), 5,58 (m, 1H), 5,01-4,03 (m, 5H), 3,75-3,32 (m, 6H), 2,22-1,31 (m, 30H). ESMS m/Z: 696 [M+H]⁺. El compuesto 4 (2 g, 2,9 mmol) se disolvió en 10 ml de una solución 1/1 de TFA/CH₂Cl₂ y se dejó en agitación a ta durante 2 h. Tras la evaporación del disolvente, el residuo sólido se lavó con 3 x 3 ml de éter dietílico y se secó al vacío para producir 5 en forma de la sal TFA. El compuesto 5 se obtuvo con un rendimiento cuantitativo y se usó sin purificación adicional después de liofilización. ¹H RMN (D₂O) δ : 8,01 (d, 2H), 7,89 (m, 2H), 7,78-7,44 (m, 4H), 4,78-4,75 (m, 2H), 4,32 (m, 1H), 4,11-4,09 (m, 1H), 4,01-3,98 (t, 1H), 3,50-3,11 (m, 3H), 3,10-2,99 (m, 2H), 2,01-1,01 (m, 12H). A una solución de DOTA-NHS (100 mg, 0,13 mmol en 0,5 ml de DMSO) se le añadieron en pequeñas porciones 5, 2TFA (32 mg, 0,04 mmol) y DIEA (0,78 mmol, 136 μ l) durante un periodo de 45 min a ta. Después, la solución se agitó durante 2 h más y la finalización de la reacción se controló usando HPLC. Después de la finalización de la reacción, la reacción se purificó por HPLC para obtener 6. El compuesto 6 se trató con una solución al 20 % de piperidina con respecto al grupo Fmoc y se purificó usando cromatografía ultrarrápida C₁₈ usando una solución 90/10 de H₂O/CH₃CN (TFA al 0,1% cada vez) y se liofilizó. ESIMS: 1046 [M+H]⁺. Este compuesto liofilizado (50 mg, 0,047 mmol) se disolvió en agua destilada (2 ml) añadida a una solución de Gd₂(CO₃)₃ (0,26 mmol en 3 ml de agua) y

se agitó a 60 °C durante 12 h. El compuesto 7 se purificó usando cromatografía ultrarrápida C₁₈ usando un gradiente de solución 90/10 a 80/20 de H₂O/CH₃CN (TFA al 0,1% cada vez) y se liofilizó. A una solución de 3 (25 mg, 0,004 mmol) en DMSO, se le añadió lentamente 7 (40 mg, 0,003 mmol) durante 30 min y se agitó durante aproximadamente 2 h a ta hasta que se completó la reacción. La finalización de la reacción se controló usando HPLC.

5 Tras completarse, la mezcla de reacción se purificó posteriormente por HPLC y el producto se liofilizó. ESI-MS: 1813,08 [M+H]⁺, observado: 1813,08. Después, el compuesto se purificó por HPLC. **Método 1:** Calc. para C₆₄H₁₀₃Gd₂N₁₅O₂₆, 1813,5681 [M]⁺; observado 1813,5681 [M+1]. Disolvente A (TFA al 0,1 % en agua) y disolvente B (TFA al 0,1 % en acetonitrilo), caudal 8 ml/min. El gradiente de elución fue del 100 % de A y el 0 % de B durante 5 min y del 100 % de A al 80 % de A y del 0 % de B al 20 % de B durante 5 - 25 min, y del 80 % de A al 20 % de A y del 20 % de B al 80 % de B durante 25-30 min.

Ácido (3S,7S)-5,13,20,28-tetraoxo-32-(2,4,6-tris(1-(2-hidroxi-3-(4,7,10-tris(carboximetil)-1,4,7,10-tetraazaciododecan-1-il)propil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenoxi)-4,6,12,21,27-pentaazadotriacontan-1,3,7,22-tetracarboxílico, sal de trigadolinio (III). Gd3. Gd3 se prepara por usando una síntesis multietapa como se muestra

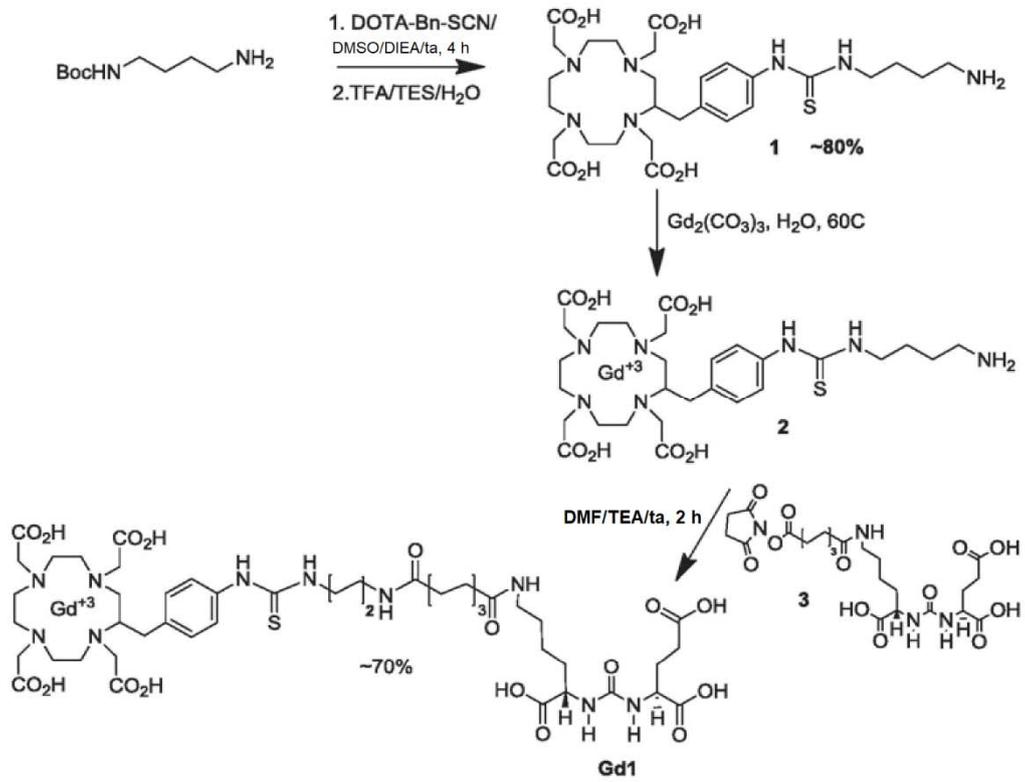
15 en el Esquema 3. El compuesto 8 se preparó siguiendo el informe anterior. **2,5-dioxopirrolidin-1-il 5-(2,4,6-trietinilfenoxi)pentanoato, 9.** A una solución de 8 (300 mg, 1,13 mmol en 5 ml de DMF) se le añadieron TSTU (440 mg, 1,47 mmol) y TEA (541 µl, 3,39 mmol) y la solución resultante se dejó en agitación a temp. ambiente durante 4 h hasta que la reacción se completó controlada por TLC. El disolvente se retiró a alto vacío y el residuo se disolvió en CH₂Cl₂ y se purificó por columna de gel de sílice usando una solución de 40/60 a 50/50 de EtOAc/hexano como eluyente. Las fracciones que contenían el producto se combinaron entre sí y se evaporaron para obtener el producto deseado en forma de un sólido incoloro. Rendimiento ~310 mg. RMN (CDCl₃): δ 7,56 (s, 2H), 4,26 (t, 2H), 3,39 (s, 2H), 3,04 (s, 1H), 2,78 (s, 4H) 2,48 (t, 2H), 2,01-1,80 (m, 4H).

25 **Sal de ácido 2,2,2-trifluoroacético de ácido (3S,7S)-26-amino-5,13,20-trioxo-4,6,12,21-tetraazahexacosan-1,3,7,22-tetracarboxílico, 10.** El compuesto 10 se preparó siguiendo un informe anterior. En resumen, a una solución de 3 Tris-t-Bu-protegido (100 mg 0,135 mmol en 1,35 ml de DMF), se le añadió H-Lys(Boc)(O-t-Bu) (59,5 mg, 0,175 mmol) seguido de DIEA (70,7 µl, 0,135) y la solución transparente se agitó durante una noche a ta. Después, la solución se concentró al vacío para obtener un residuo oleoso transparente. El residuo se disolvió en 2:1 de MeCN/agua (6 ml) y se liofilizó para obtener un producto espumoso transparente. Rendimiento. El producto se usó sin purificación adicional. Rendimiento: 117 mg, 0,126 mmol, 93 %. ESI-MS: 928 [M+H]⁺. El compuesto se disolvió en una solución enfriada con hielo de 2 ml de TFA/CH₂Cl₂ seguido de la adición gota a gota de TES (278 µl, 1,7 mmol). La solución transparente se mantuvo en agitación durante 5 h, y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en 5 ml de agua y se purificó usando cromatografía ultrarrápida de fase inversa. El producto se eluyó usando 80/20 de agua/CH₃CN (TFA al 0,1 % cada vez). ESI-MS: 603 [M+H]⁺.

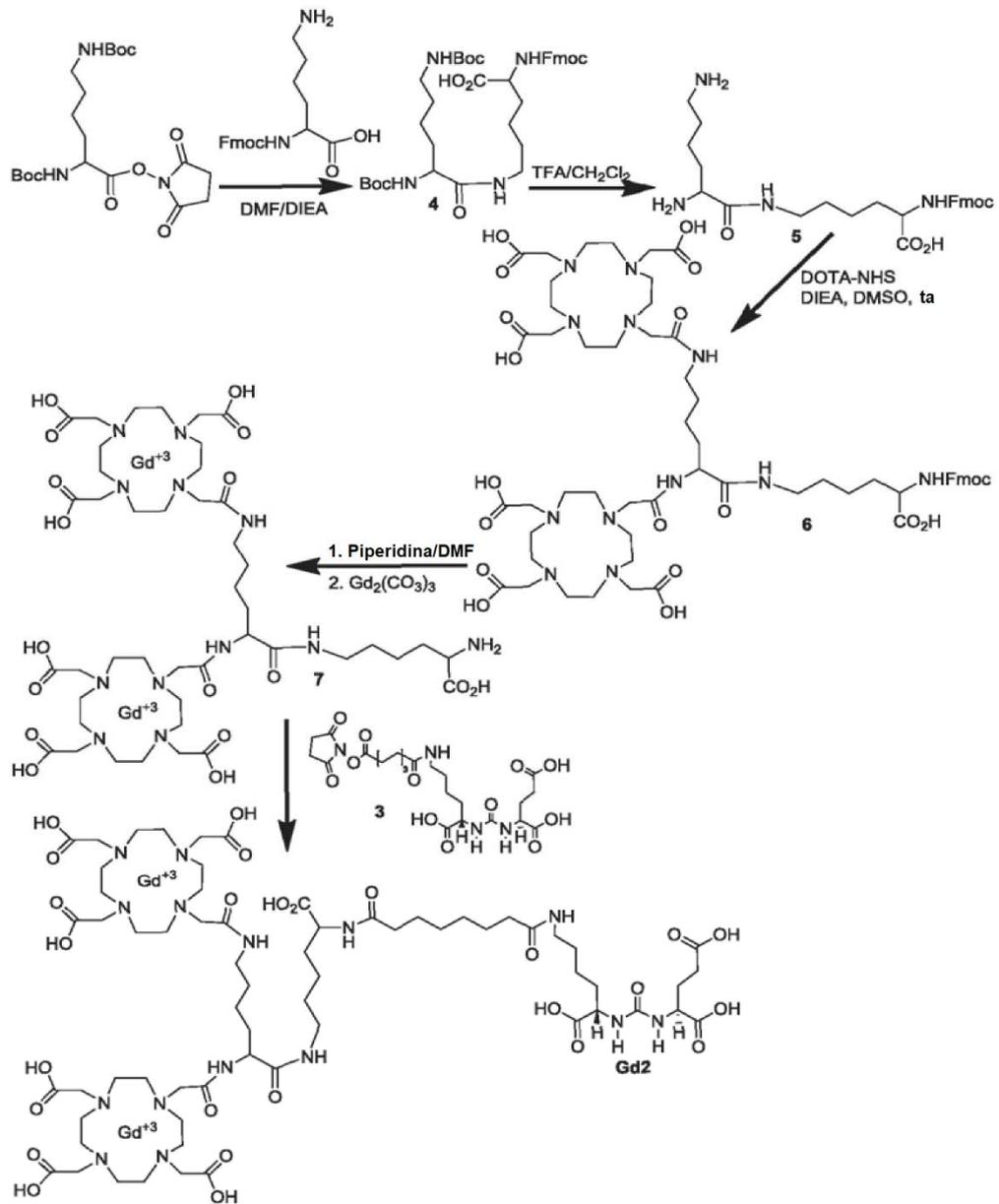
35 **Ácido (3S,7S)-5,13,20,28-tetraoxo-32-(2,4,6-trietinilfenoxi)-4,6,12,21,27-pentaazadotriacontan-1,3,7,22-tetracarboxílico, 11.** El compuesto 9 (132 mg, 0,362 mmol) se añadió en una porción a una solución que contenía sal de ácido 2,2,2-trifluoroacético de ácido (3S,7S)-26-amino-5,13,20-trioxo-4,6,12,21-tetraazahexacosan-1,3,7,22-tetracarboxílico (260 mg, 0,362 mmol), trietilamina (0,202 ml, 1,44 mmol) y DMF (3,62 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h y se concentró para dar un residuo de color castaño. El residuo se disolvió en 1/1 de agua/acetonitrilo (3 ml) y se purificó usando cromatografía ultrarrápida C₁₈ de fase inversa con un gradiente por etapas que consistía en agua al 100 %, TFA al 0,1 %, seguido de 80/20, 60/40 de agua/acetonitrilo (TFA al 0,1 % cada vez). Cada etapa de gradiente consistió en aproximadamente 144 ml de volumen de disolvente. El caudal fue 40 ml/min. Las fracciones que contenían el producto deseado se concentraron para dar un residuo y se liofilizaron para dar ácido (3S,7S)-5,13,20,28-tetraoxo-32-(2,4,6-trietinilfenoxi)-4,6,12,21,27-pentaazadotriacontan-1,3,7,22-tetracarboxílico en forma de un sólido de color blanco. 169 mg, rendimiento del 54 %). ESI-MS calc. para C₄₃H₅₇N₅O₁₃ [M+H]⁺ 852,4, observado 851,9. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) 12,12 (s a, 4H) 8,01 (d, 1H), 7,76 (m, 2 H), 7,57 (s, 2H), 6,33 (m, 2H), 4,47 (s, 2H), 4,28 (s, 1H), 4,09 - 4,15 (m, 4H), 3,00 (m, 4H), 2,21-2,27 (m, 2H), 2,10 (m, 4H), 2,02 (t, 2H), 1,89-1,94 (m, 1H), 1,22 - 1,69 (m, 24H). ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ 175,0, 174,6, 174,3, 174,1, 172,8, 172,3, 172,1, 162,1, 158,9, 158,5, 157,7, 137,6, 118,0, 117,5, 86,6, 82,0, 81,5, 78,6, 74,1, 52,7, 52,1, 38,7, 38,6, 35,8, 35,5, 32,2, 31,1, 30,3, 29,7, 29,3, 29,2, 28,9, 28,8, 27,9, 25,7, 25,6, 23,3, 23,0, 22,1.

55 **Gd3.** A una mezcla que contenía ácido (3S,7S)-5,13,20,28-tetraoxo-32-(2,4,6-trietinilfenoxi)-4,6,12,21,27-pentaazadotriacontan-1,3,7,22-tetracarboxílico (12 mg, 0,14 mmol), el compuesto 002 (28 mg, 0,046 mmol) y *t*-butanol (0,1 ml) se le añadió agua (0,05 ml) seguido de TBTA (0,15 mg, 0,3 µmol) y hexafluorofosfato de tetraquis(acetonitrilo)cobre (I) (0,11 mg, 0,3 µmol). La mezcla se agitó a 65 °C durante 18 h. La mezcla de reacción se disolvió en 2,5 ml de bicarbonato sódico al 0,1 % y se filtró. La solución obtenida de este modo se purificó por HPLC usando una columna Phenomenex, Luna, 10 micrómetros, de 10 x 250 mm y un gradiente que consistía en acetonitrilo al 0-95 %:agua durante 20 minutos. El producto deseado (003) se eluyó a 6,1-7,1 minutos. Las fracciones que contenían 003 se combinaron, se concentraron y se liofilizaron para proporcionar un sólido de color blanco. 13 mg, rendimiento del 34 %). ESI-MS calc. para C₉₄H₁₄₁Gd₃N₂₆O₃₄ [M -H]⁻ 2650,7, observado 2648,9.

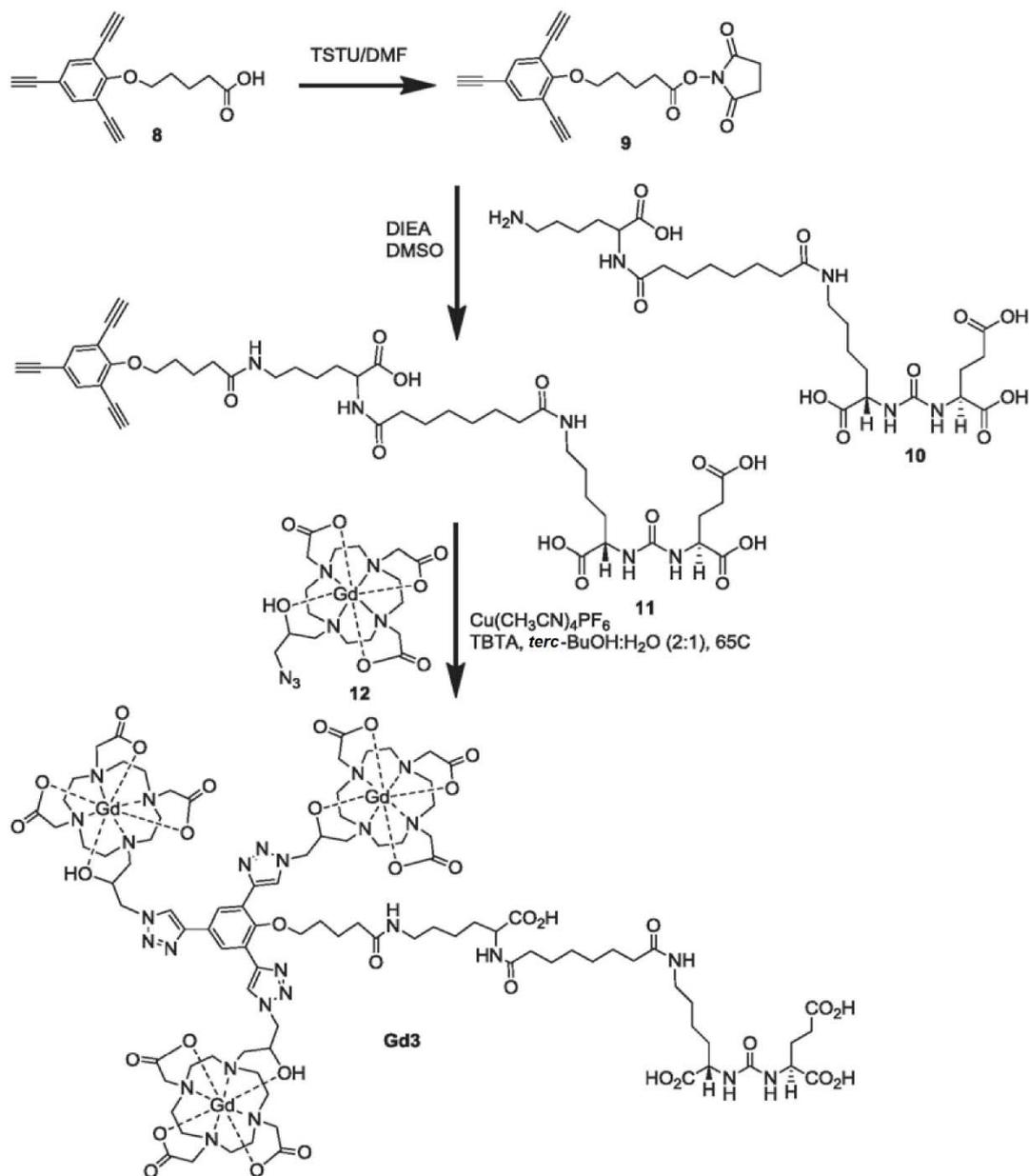
Esquema 1



Esquema 2



Esquema 3



Resultados

5

Las estructuras de agentes de contraste de PSMA representativos Gd mono, di y trimérico (Gd1 - **Ejemplo de referencia**, Gd2 y Gd3) se muestran en la figura 1A que contienen Lys-Glu urea como resto de direccionamiento. Se desarrollaron métodos sintéticos de fase de solución multietapa para preparar los compuestos objetivo y se describen en los Esquemas 1-3.

10

Para los tres compuestos, se usó el agente quelante DOTA ya que forma complejos con alta estabilidad termodinámica y cinética. Gd1 (Ejemplo de referencia) contiene DOTA-Bn-SCN para proporcionar una mayor relajación. La estructura de Gd1 se basa en el agente de imagen marcado con plomo ⁸⁶Y recientemente informado para tomografía por emisión de positrones (PET), que demostró una acumulación tumoral alta y específica en un modelo preclínico (Banerjee, et al. 2015). Gd2 se preparó conjugando tanto α- como ε- aminas de lisina con DOTA-NHS, empleando una estrategia de síntesis peptídica basada en solución. En las mismas condiciones, los rendimientos de las reacciones de acoplamiento mejoraron significativamente cuando la reacción se realizó en un baño de sonicación a temperatura ambiente. Gd3 contiene un núcleo fenólico al que se unieron tres Gd (III)-DOTA a través de un enlace de triazol rígido, según lo informado previamente por Mastarone et al. usando la química de clic. En este núcleo, se conjugó la funcionalidad de direccionamiento a PSMA a través del oxígeno fenólico. Gd3 demostró relaciones relativamente

20

altas como resultado del aumento de la rigidez del resto de enlazador triazol. Los compuestos se purificaron por HPLC de fase inversa y se caracterizaron por LCMS. Para determinar cualquier efecto potencialmente negativo de la porción que contiene Gd (III) de los agentes sobre las afinidades de unión de las sondas, se determinaron los valores de la constante de inhibición de PSMA (K_i) para **Gd1** (Ejemplo de referencia), **Gd2** y **Gd3** usando un ensayo de inhibición de PSMA basado en fluorescencia y se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades físicas de los agentes de contraste

Compuesto	Masa molar (g/mol)	r_1 ^[a] ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)	T_1 ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)	K_i [nM] ^[b]	CI del 95 % de K_i [nM]
Gd1 (Ejemplo de referencia)	1250,40	3,0	2,65	0,45	0,36-0,55
Gd2	1803,13	6,2/12,5	5,44	18,18	14,07-22,16
Gd3	2651,03	3,3/9,81	12,47	7,19	5,17-10,01

^[a] Las relajaciones indicadas indican la relajación iónica/molecular de los agentes, respectivamente.

^[b] **ZJ43** (K_i 0,29; CI al 95 % de K_i 0,22-0,39 nM).

El inhibidor de PSMA de alta afinidad conocido, ácido N-[[[(S)-1-carboxi-3-metilbutil]amino]carbonil]-L-glutámico (ZJ43) (Olszewski et al., 2004), se usó como ligando de referencia. Como cabía esperar, todos los compuestos mostraron una alta afinidad de unión con valores de K_i que variaban, siendo la más alta para **Gd1** (Ejemplo de referencia - 0,45 nM) seguido de **Gd3** (7,19 nM) y **Gd2** (18,18 nM) la más baja. Cuando se tomaron imágenes a 9,4T y a 25 °C, los fantasmas de la solución indicaron relajaciones de r_1 en PBS que variaban entre 3,0 y 6,2 $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ por Gd (III) y entre 3,0 y 12,5 $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ por agente de contraste (Tabla 1). Como cabía esperar, **Gd1** (Ejemplo de referencia) tiene la relajación más baja seguida de **Gd2** y **Gd3** a 25 °C. Para determinar la selectividad y especificidad de los agentes, las células de cáncer de próstata humano genéticamente modificadas para expresar grandes cantidades de PSMA (PIP PC3) y las células de tipo silvestre, sin expresión de PSMA (gripe PC3) correspondientes se seleccionaron como control negativo (Banerjee, Angew., 2001). Después de la incubación con **Gd1** (Ejemplo de referencia) o **Gd2**, las células de PIP PC3 PSMA+ y gripe PC3 PSMA- sedimentadas no mostraron contraste de RM ponderado en T_1 ni cambios en R_1 . Por el contrario, las imágenes ponderadas en T_1 de ambas líneas celulares incubadas con **Gd3** mostraron una mejora significativa del contraste de RM en células PIP PC3 PSMA+ en comparación con las células no marcadas, así como con los sedimentos de células de gripe PC3 PSMA- como se muestra en la figura 4A. La mejora y las mediciones de T_1 por medio de IRM de los sedimentos celulares en presencia y ausencia de **Gd3** 50 μM indicaron una mayor mejora y diferencia en las tasas de relajación en T_1 , ΔR_1 entre células PIP tratadas con **Gd3** y las células PIP de control en comparación con las células de gripe tratadas con **Gd3** y las células de control de gripe de control, después de la eliminación del **Gd3** del sistema celular mediante lavado con medio estándar (figura 4B y figura 4C).

El experimento de bloqueo selectivo mediante la incubación conjunta de **Gd3** y ZJ43 mostró de hecho un bloqueo significativo de la mejora en T_1 . Las células incubadas con **Gd3** en presencia de ZJ43 mostraron solo cambios menores en el valor de T_1 en ambos tipos de células, lo que indica que ZJ43 pudo bloquear la unión de **Gd3** específicamente. Esos resultados indicaron que **Gd3** presentó una unión celular específica del receptor en células PIP PC3 PSMA+ y mostró una mejora del contraste mediada por PSMA, demostrando el concepto de endocitosis mediada por receptor. El análisis ICP-MS de las células después del análisis posterior a la imagen mostró que había Gd (III) insignificante asociado con los sedimentos de células de gripe PC3, mientras que los sedimentos de células PIP PC3 tienen una gran cantidad de Gd (figura 2 y figura 3). Los sedimentos celulares de PIP PC3 PSMA+ tenían una concentración de Gd(III) intracelular estimada de $\sim 22,82 \mu\text{M}$ para **Gd3** seguido de $\sim 12,5 \mu\text{M}$ y $\sim 7,2 \mu\text{M}$ para **Gd2** y **Gd1** (Ejemplo de referencia), respectivamente (figura 2). Por lo tanto, la diferencia entre ΔR_1 de las células PIP y de las células de gripe refleja el cambio debido a la unión específica de **Gd3** a PSMA en las células PIP.

Un ensayo de internalización celular reveló que el porcentaje de dosis incubada (% de ID) que experimentó internalización en células PIP PC3 PSMA+ para **Gd1** (Ejemplo de referencia) y **Gd2** era $9,06 \pm 0,31$ y $21,63 \pm 3,51$ después de 4 h de incubación, respectivamente, mientras que solamente el $2,42 \pm 0,11$ y el $3,51 \pm 1,32$ % de ID se asoció con la superficie celular en ese momento (figura 3). Además, una captación no específica ligeramente más alta se asoció con **Gd2** en las células de gripe PC3 PSMA-, lo que podría estar relacionado con el menor valor de K_i de este agente en comparación con **Gd1** (Ejemplo de referencia). Como un control adicional sobre la captación e internalización celular, se preparó un agente de contraste monomérico de Gd de modalidad dual marcado con Rhodamine-Red™-X para confirmar la internalización mediada por PSMA de esta clase de agentes de contraste (figura 5D). Como se esperaba, el agente demostró una acumulación específica y alta solo en las células PIP PC3 PSMA+ (figura 5A a la figura 5C). Estos resultados muestran que los receptores celulares expresados a este nivel pueden detectarse mediante IRM utilizando estos simples agentes dirigidos.

Se realizó un estudio de internalización dependiente del tiempo para **Gd3** (figura 6A y figura 6B) después de 1, 4 y 24 h de incubación. La captación intracelular a las 1 y 4 h fue alta y específica, $28,30 \pm 0,47$ y $39,92 \pm 3,59$ % de ID, respectivamente, en las células PIP PC3 PSMA+, mientras que 24 h después de la incubación, se observó $\sim 89,69 \pm 3,90$ % de ID. Una cantidad similar de Gd (~ 33 - 37 % de ID) se asoció con la membrana celular en estos mismos

puntos de tiempo. Estos resultados indican que la mejora detectable ponderada en T_1 de **Gd3** en los sedimentos celulares de PIP PC3 PSMA+ se correlacionó bien con la alta acumulación específica de **Gd3** en las células PIP PSMA+.

- 5 Antes de evaluar **Gd3** para imágenes de ratones vivos, se examinó su biocompatibilidad usando un ensayo de proliferación celular. Se incubaron diversas concentraciones de **Gd3** con células PIP PC3 PSMA+ y de gripe PC3 PSMA-, durante 24 h. **Gd3** no tuvo un efecto significativo sobre la viabilidad de las células de gripe PSMA- hasta una concentración de Gd (III) de 1 mM (es decir, ~90 % de viabilidad) (figura 7). Sin embargo, las concentraciones de Gd(III) de >1 mM afectaron a la viabilidad celular de PIP PC3 PSMA+ (figura 8). El nivel observado de muerte celular
10 de PIP PC3 PSMA+ puede atribuirse a la alta internalización celular de **Gd3**, y al largo tiempo de incubación empleado (24 h).

Las imágenes por RM *in vivo* se realizaron usando ratones NOD/SCID macho portadores de tumor PIP PC3 PSMA+ (derecha) y de gripe PC3 PSMA- (izquierda) implantados por vía subcutánea en el costado inferior derecho e izquierdo respectivamente, después de la inyección intravenosa de **Gd3** (dosis de 0,05 mmol/kg) en 9,4 T. Durante los primeros 20 min después de la inyección, tanto los tumores PIP como los de gripe recibieron una captación no específica. Se observó una fuerte disminución de los valores de T_1 en todos los tejidos, siendo la gripe PSMA el más alto 0,63 s, seguido del tumor PIP de 0,57 s, y de músculo 0,261 s. De manera significativa, se observó una depuración rápida del agente de contraste del tumor de músculo y de gripe. La mejora del contraste en el tumor PIP fue más alta, 36 %, 40 min después de la inyección, y permaneció alta al 30 % hasta 1,5 h después de la inyección. A las 3 h, se encontraron valores de T_1 de tumor de músculo y de gripe que volvieron a los valores iniciales, mientras que los valores de T_1 de tumor PIP no mostraron cambios significativos.

Las imágenes por RM *in vivo* de **Gd3** también se realizaron en ratones portadores xenoinjertos de tumor PIP PC3 PSMA+ y de gripe PC3 PSMA- implantados por vía subcutánea en el costado inferior derecho e izquierdo, respectivamente, después de una sola inyección intravenosa de bolo (0,06 mmol/kg). La figura 9A muestra mapeo cuantitativo de mejora de contraste (ΔR_1) de cortes de 1 mm para ambos tumores de 40 a 160 min después de la inyección. La mejora del contraste permaneció constante durante al menos 3 h dentro del tumor PIP PC3 PSMA+, pero disminuyó rápidamente dentro del tumor de gripe PC3 PSMA- y los tejidos musculares. Los cambios en los valores de T_1 del tumor PIP PC3 PSMA+ (figura 10A y la figura 10B) alcanzaron un mínimo de $1,819 \pm 76$ ms (media \pm DE, mejora promedio del 36 % en los valores de R_1 , $n = 4$) en los primeros 40 a 60 min, y permanecieron constantes, al 29 %, hasta 90 min, y disminuyeron lentamente al 24 % 190 min después de la inyección. Para los tumores de gripe PC3 PSMA-, la mejora de contraste más alta fue ~24 % 20 min después de la inyección, seguida de una disminución rápida en la mejora de contraste ($\Delta R_1 < 20$ % después de 40 min). Estos resultados demuestran una mejora de contraste específica para los tumores PIP PC3 PSMA+ ($P \leq 0,05$) 80 y 120 min después de la inyección. Como se muestra en la figura 9B, estos resultados se compararon directamente con otros ratones a los que se les administró de la misma forma usando una sonda de Gd trimérica sin un resto de direccionamiento, que no mostraron mejora tumoral (Mastarone, 2011).

40 Bajo la misma condición experimental, un estudio de control con solución salina (PBS) no mostró ningún cambio en el valor de T_1 para tumor PIP y de gripe (figura 12).

Sin desear quedar ligado a teoría alguna concreta, tras la unión con PSMA, el tiempo de correlación rotacional de **Gd3** aumentó en relación con el estado no unido. La unión también puede haber cambiado el número de hidratación y la tasa de intercambio de agua para cada agente, lo que podría cambiar los valores de relajación de los esperados a partir de las relajaciones de los agentes de contraste libres (Caravan et al., 2007). Además, en campos altos, el aumento del tiempo de correlación rotacional puede reducir ligeramente la relajación debido a la interacción del agente de contraste con los componentes celulares (Caravan, P., et al. 2009; De Leon-Rodriguez, L.M., et al. 2010; Geninatti-Crich, S. 2011). Al aprovechar complejos sensibles, multiméricos de Gd (III) en combinación con una molécula pequeña dirigida a PSMA establecida, se realizaron imágenes moleculares por RM dirigidas a PSMA *in vitro* e *in vivo*.

En resumen, se ha demostrado que el agente de contraste basado en Gd **Gd3**, podría usarse para la obtención de imágenes por RM específicas de PSMA *in vivo* usando xenoinjertos de ratón. La optimización de las construcciones descritas para el uso traduccional en cáncer de próstata y otros cánceres está en marcha.

55 EJEMPLO 2

Concentración de receptor de PSMA

60 $N.^{\circ}$ de receptores por célula (N.R.C.) = $4,9 \times 10^6$, $r_{célula} = 8,75 \mu m$

$$\begin{aligned} \text{Volumen de células PC3} &= \frac{4}{3} \pi r_{célula}^3 = \sim 2,57 \text{ pl} \\ [\text{PSMA}]_{célula} &= \frac{N.R.C./N_A}{\frac{4}{3} \pi r_{célula}^3} = \sim 3,16 \mu M \end{aligned}$$

Por lo tanto, para ver un cambio de $0,05 \text{ s}^{-1}$ (aproximadamente un 10 % de mejora, considerando el T_0^1 tisular = 2 s), relajación requerida (si receptor: contraste 1:1)

$$r_i = \frac{\Delta\left(\frac{1}{T}\right)}{[CA^1]} = \sim 16 \text{ s}^{-1} \text{mM}^{-1}$$

EJEMPLO DE REFERENCIA 3

10 Evaluación preclínica de inhibidores marcados con ^{86}Y de antígeno prostático específico de membrana para estimaciones de dosimetría

Descripción general

15 ^{86}Y (semivida = 14,74 h, 33 % de β^+) se encuentra dentro de una clase emergente de isótopos emisores de positrones con semividas físicas relativamente largas que permiten obtener imágenes extendidas de los procesos biológicos. Se ha informado sobre la preparación e investigación de la biodistribución de tres ureas de unión a PSMA marcadas con ^{86}Y de bajo peso molecular (figura 14) en un modelo experimental de roedor, así como la obtención de imágenes del agente farmacocinéticamente más favorable en primates no humanos para la dosimetría de radiación en la preparación para ensayos clínicos con los correspondientes agentes marcados con ^{90}Y y ^{177}Lu .

20 Se usaron síntesis multietapa en la preparación de [^{86}Y]-4-6. Las constantes de inhibición de PSMA se evaluaron mediante un ensayo de unión competitiva. La caracterización *in vivo* usando ratones macho portadores de tumor se realizó por PET/CT para [^{86}Y]-4-6 y por estudios de biodistribución de [^{86}Y]-4 y [^{86}Y]-6 hasta 24 h después de la inyección. Se registraron exploraciones PET cuantitativas de cuerpo entero para medir la cinética de 14 órganos en un babuino macho usando [^{86}Y]-6.

30 Los compuestos [^{86}Y]-4-6 se obtuvieron con un rendimiento radioquímico y pureza altos, con radioactividades específicas de más de 83,92 GBq/ μmol . Las imágenes de PET y los estudios de biodistribución que usan ratones portadores de tumor PIP PC-3 PSMA $\frac{1}{2}$ positivo y de gripe PC-3 PSMA negativo revelaron que [^{86}Y]-4-6 tenía una alta captación específica de sitio en el tumor PIP PC-3 PSMA positivo a partir de 20 min después de la inyección y se mantuvo alta a las 24 h. El compuesto [^{86}Y]-6 demostró la captación y retención de tumores más alta, con un porcentaje de $32,17 \pm 7,99$ y $15,79 \pm 6,44$ de dosis inyectada por gramo (% de ID/g) a las 5 y 24 h, respectivamente. Las bajas concentraciones de actividad se asociaron con la sangre y órganos normales, a excepción de los riñones, un tejido que expresa PSMA. Las imágenes por PET en babuinos revelan que todos los órganos tienen una depuración de 2 fases (rápida y lenta), con la mayor captación (8 % de ID/g) en los riñones a los 25 min. La cinética de captación absoluta individual se utilizó para calcular las dosis de radiación utilizando el software OLINDA/EXM. La corteza absorbida media más alta fue recibida por la corteza renal, con 1,9 mGy por MBq de [^{86}Y]-6.

Materiales y métodos

40 Los disolventes y productos químicos obtenidos de fuentes comerciales fueron de calidad analítica o mejor y se usaron sin purificación adicional. Todos los aminoácidos protegidos con 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), incluida la resina Fmoc-Lys(Boc)-Wang, 1-hidroxibenzotriazol monohidrato y hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) se adquirieron en Chem Impex International Inc. (Wooddale, IL). Se obtuvo [^{86}Y](NO $_3$) $_3$ sin vehículo en el National Cancer Institute of the National Institutes of Health (Bethesda). Se adquirieron DOTA-tris(éster t-butílico)-monoácido y p-SCN-Bn-DOTA(B-205) en Macroclitics, Inc. (Dallas, TX). El nitrato de itrio (III), trietilsilano (Et $_3$ SiH), diisopropiletilamina (DIEA) y trietilamina (TEA) se adquirieron en Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE.UU.). Todos los demás productos químicos se adquirieron en Thermo Fisher Scientific (Pittsburgh, PA) a menos que se especifique de otro modo. La cromatografía analítica de capa fina (TLC) se realizó utilizando placas gel de sílice Z19 329-1 de 0,2 mm revestidas de aluminio de Aldrich y se visualizó mediante luz ultravioleta (254 nm), I $_2$ y ninhidrina al 1 % en EtOH. La cromatografía ultrarrápida se realizó usando gel de sílice adquirido en Bodman (Aston, PA), MP SiliTech 32-63 D 60 Å. Todos los experimentos se realizaron por duplicado o por triplicado para garantizar la reproducibilidad. Los espectros de ^1H RMN se registraron en un espectrómetro Bruker Ultrashield $^{\text{TM}}$ de 400 MHz. Los cambios químicos (δ) se informan en ppm campo abajo por referencia a las resonancias de protones resultantes de la deutерación incompleta del disolvente de RMN. Los espectros de masas ESI de baja resolución se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus, Billerica, MA. Los espectros de masas de alta resolución se obtuvieron por el Centro de Espectrometría de Masas y Proteómica de la Universidad de Notre Dame, Notre Dame, IN usando ESI por infusión directa en un micrOTOF-II Bruker o por elución LC a través de RSLC Dionex de presión ultra alta con una columna C $_{18}$ acoplada con un micrOTOF-Q II Bruker.

60 La purificación por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de 4-6 y [^{89}Y]-4-6 se realizó usando una columna Phenomenex C $_{18}$ Luna 10 x 250 mm 2 en un sistema Waters 600E Delta LC con un detector UV/Vis de longitud de onda variable Waters 486, ambos controlados por el software Empower (Waters Corporation, Milford, MA) (figura 15A y figura 15B, figura 16A y figura 16B, y figura 17A, figura 17B y figura 17C). El análisis por HPLC se realizó usando los

siguientes métodos usando el disolvente A (TFA al 0,1 % en agua) y el disolvente B (TFA al 0,1 % en acetonitrilo).

Método 1: El gradiente de elución fue del 75 % de A y el 25 % de B durante 5 min y del 75 % de A al 60 % de A y del 25 % de B al 40 % de B durante 5 - 25 min, y del 60 % de A al 75 % de A y del 40 % de B al 25 % de B durante 25-30 min, caudal 8 ml/min. **Método 2:** caudal 8 ml/min. El gradiente de elución fue del 100 % de A y el 0 % de B durante 0 - 5 min, y del 100 % de A al 45 % de A y del 0 % de B al 55 % de B durante 5 - 45 min. La purificación por HPLC de [⁸⁶Y]4-6 se realizó en un sistema Varian Prostar (Palo Alto, CA), equipado con un detector de absorbancia UV modelo 490 y un detector de centelleo Bioscan Nal conectado a un sistema de recuento de flujo Bioscan (Bioscan, Washington D.C., EE.UU.). Para la purificación por HPLC de [⁸⁶Y]4-6 se usó una columna Waters Novapak C₁₈ 150 x 3,9 mm². El análisis por HPLC se realizó usando los siguientes métodos usando el disolvente A (TFA al 0,1 % en agua) y el disolvente B (TFA al 0,1 % en CH₃CN) y un caudal de 1 ml/min. Se usó un método isocrático al 85 % de A y al 15 % de B durante 25 min para la purificación de [⁸⁶Y]4. Un método de gradiente, durante 0-5 min al 78 % de A y al 22 % de B, durante 5-25 min del 78 % de A al 58 % de A y del 22 % de B al 42 % de B se empleó para [⁸⁶Y]5. Un método de gradiente durante 0-5 min al 88 % de A y el 12 % de B, durante 5-25 min del 88 % de A al 68 % de A y del 12 % de B al 32 % de B se usó para la purificación de [⁸⁶Y]6. La radioactividad específica se calculó como la radioactividad que eluye en el tiempo de retención del producto durante la purificación por HPLC preparativa dividida por la masa correspondiente al área bajo la curva de captación UV. Todos los compuestos finales se obtuvieron con una pureza radioquímica >95 %, según se determinó por HPLC. El compuesto 1 se preparó siguiendo un informe anterior (Banerjee, Pullambhatla, Byun, et al., 2011). Los compuestos 4 y 5 se prepararon por el mismo método general que se informó anteriormente para 4 (Banerjee et al., 2010), y se menciona brevemente a continuación para 5.

Síntesis y radioquímica:

Ácido (13S,27S,31S)-4,7,10-tribencil-2,5,8,11,18,21,29-heptaoxo-1-(4,7,10-tris(carboximetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1-il)-3,6,9,12,17,22,28,30-octaazatritriacontan-13,27,31,33-tetracarboxílico, 5. El

compuesto **5** se preparó siguiendo un informe anterior ((Banerjee et al., 2010) como se describe en el **Esquema 4**. Los compuestos **3** y **4** se prepararon siguiendo una estrategia peptídica en fase sólida. La resina Fmoc-Lys(Boc)-Wang (100 mg, 0,43 mM) se dejó hinchar con CH₂Cl₂ (3 ml) seguido de DMF (3 ml). Una solución de piperidina al 20 % en DMF (3 x 3 ml) se añadió a la resina que después se agitó suavemente en un agitador mecánico durante 30 min a temperatura ambiente. La resina se lavó con DMF (3 x 3 ml) y CH₂Cl₂ (3 x 3 ml). La formación de amina libre se evaluó por la prueba de Kaiser (Kaiser et al., 1970). Después de hinchar la resina en DMF, se añadió una solución de Fmoc-Phe-OH (3 equiv.), HBTU (3 equiv.), HOBT (3 equiv.), y DIPEA (4,0 equiv.) en DMF y se agitó suavemente durante 2 h. Después, la resina se lavó con DMF (3 x 3 ml) y CH₂Cl₂ (3 x 3 ml). La eficiencia de acoplamiento se evaluó por la prueba de Kaiser. Esta secuencia mencionada anteriormente se repitió durante dos etapas de acoplamiento más con Fmoc-Phe-OH y DOTA-(éster t-butilico)₃-CO₂H. El compuesto final se escindió en la resina usando TFA/CH₂Cl₂ (1/1) y se concentró al vacío para producir **3**. El producto concentrado se purificó por usando una columna C₁₈ SepPak Vac de 2 g. El producto se eluyó con una solución 70/30 de agua/acetonitrilo (TFA al 0,1 % cada vez) y se liofilizó. ESI-MS: 974 [M+H]⁺. A una solución de **3** (15 mg, 15,4 μmol en 1 ml de DMSO) se le añadió **1** (15 mg, 26,18 μmol) y TEA (30 μl) y se dejó a temperatura ambiente durante 2 h. Después de la eliminación del disolvente, el compuesto **5** se purificó por HPLC (Método 1). ¹H RMN (DMSO-d₆) δ: 8,64(m, 1H), 8,44(m, 1H), 8,29-8,18 (m, 2H), 7,77-7,75 (m, 2H), 7,30-7,17 (m, 15H), 6,35-6,33 (m, 2H), 4,65-4,63 (m, 2H), 4,17-2,59 (m, 26), 2,40-1,11 (m, 30H). ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ: 175,00, 174,64, 173,82, 173,52, 172,11, 172,02, 171,05, 170,95, 158,20, 157,88, 157,39, 137,79, 137,67, 137,52, 129,52, 129,34, 129,27, 126,35, 54,01, 53,61, 52,36, 51,74, 38,37, 38,31, 37,65, 35,52, 31,88, 29,98, 28,95, 27,61, 25,33, 22,92, 22,73. ESI-MS: 1431 [M+H]⁺, HRESI-MS: Calc. para C₆₉H₉₆N₁₂O₂₁, 1431,7042 [M+H]⁺, observado: 1431,7064.

Ácido (21S,25S)-8,15,23-trioxo-1-((4-((1,4,7,10-tetraquis(carboximetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-2-il)metil)fenil)amino)-1-tioxo-2,7,16,22,24-pentaazaheptacosano-21,25,27-tricarboxílico, 6. El compuesto **6** se preparó en tres etapas como se describe a continuación. N-Boc-1,4 diaminobutano disponible comercialmente (27 mg, 0,15 mmol en 0,5 ml de DMSO) se mezcló con ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacético, 2-[(4-isotiocianatofenil)metilo] (p-SCN-Bn-DOTA) (100 mg, 0,15 mmol en 1,5 ml de DMSO) y DIEA (132 μl, 0,75 mmol) y se agitó a 40 °C durante 4 h. El disolvente se evaporó y el residuo sólido se purificó por cromatografía ultrarrápida C₁₈ de fase inversa (5,5 g, Agilent SF10) usando agua y acetonitrilo (TFA al 0,1 % cada vez) para obtener **7** Boc-prottegido después de la liofilización. Rendimiento: ~55 %. ESI-MS 740 [M+H]⁺. El compuesto resultante de esta etapa se trató entonces con una solución enfriada con hielo de TFA/CH₂Cl₂ (1/1) y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. El disolvente se evaporó y el residuo se secó al vacío y se purificó por cromatografía ultrarrápida de fase inversa (5,5 g, Agilent SF10) para producir **7** con un rendimiento moderado. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ: 8,80-8,64 (m, 1H), 8,12-7,90 (m, 2H), 7,75-7,10 (m a, 4H), 4,65-4,63 (m, 1H), 4,17-2,59 (m, 27H), 2,40-1,11 (m, 6H). ESI-MS: 640 [M+1]⁺. A una solución de **7** (11 mg, 17 μmol en 400 μl DMSO) se le añadieron **1** (10 mg, 17,4 μmol en 200 μl DMSO) y DIEA (27 μl, 170 μmol) y se dejó a temperatura ambiente durante 2 h. Después de la evaporación del disolvente, el residuo se disolvió en agua y se purificó por HPLC (Método 2) para obtener **6**. T_r, 22,5 min. ¹H RMN (DMSO-d₆) δ: 8,88(m, 1H), 8,44(m, 1H), 8,21-7,98 (m, 2H), 7,77-7,75 (m, 2H), 6,35-6,33 (m, 2H), 4,65-4,63 (m, 2H), 4,17-2,59 (m, 29 H), 2,40-1,11 (m, 30H). HRESI-MS: Calc. para C₄₈H₇₇N₁₀O₁₇S, 1097,5183 [M+H]⁺, observado: 1097,5212.

[⁸⁹Y]4. A una solución de **4** (10 mg, 9,11 μmol en 500 μl de NaOAc 0,5 M, pH 6,8) se le añadieron 50 μl de YNO₃ (0,5 M), y la mezcla (pH 6,1) se incubó durante 30 min a 90 °C. Se añadió una solución de EDTA (200 μl, 30 mM, pH 6,0), y la mezcla de reacción se incubó durante 10 min a 40 °C para formar complejo de itrio (III) sin reaccionar. El

compuesto resultante se purificó por HPLC (Método 2, Tr, 21 min), se concentró por evaporación y se liofilizó. ESI-MS: 1370 [M+H]⁺. Calc. para C₆₀H₈₇N₁₁O₂₀Y, 1370,5187; observado 1370,5435.

5 ⁸⁹Y]5. Purificación HPLC por el método 2, Tr, 26 min, ESI-MS: 1517 [M+H]⁺. Calc. para C₆₉H₉₆N₁₂O₂₁Y, [M+H]⁺ 1516,5793; observado 1516,5793.

⁸⁹Y]6. HPLC, Método 2, Tr, 23 min. HRESI+-MS. Calc. para C₄₈H₇₇N₁₀O₁₇SY, 1183,4007 [M+H]⁺; observado 1183,4020.

10 *Radioquímica*: El radiomarcado de [⁸⁶Y]4-5 y [⁸⁶Y]6 se realizó siguiendo el mismo método general que se describe para [⁸⁶Y]6.

15 [⁸⁶Y]6. Se añadió una solución recién preparada de ácido ascórbico (50 µl, 220 µg) a una solución de ⁸⁶YNO₃ (111-148 MBq (3-4 mCi) en 0,1 M 500 µl de ácido nítrico) para impedir la radiólisis. Se añadieron aproximadamente 50 - 70 µg de 6 en NaOAc 0,3 M (purgado en una atmósfera de N₂ durante 2-3 min) a esta solución y se neutralizó a pH ~5,5 - 6 añadiendo 60 µl de NaOAc 3 M seguido de una breve agitación vorticial de la mezcla, que posteriormente se incubó durante 20 min a 95 °C. La mezcla de reacción se diluyó con 1 ml de agua. La formación de complejo se controló por inyección de alícuotas de 10 - 15 µl de la solución en la HPLC. El producto radiomarcado [⁸⁶Y]6 se obtuvo con un rendimiento radioquímico de ~90-95 % con una pureza radioquímica >98 %, según se midió por ITLC (tiras Gelman ITLC, EDTA 10 mM). Se obtuvo un pico radioactivo ancho R_t, ~13,9-14,8 min, para el producto deseado como compuestos isoméricos de mezcla y el T_r para el ligando libre fue de 15,8 min. La radioactividad específica fue >83,92 GBq/µmol (n = 5). El eluato ácido se neutralizó con 20 µl de una solución 1 M de carbonato sódico y el volumen del eluato se redujo al vacío a sequedad. El residuo sólido se diluyó con una solución salina hasta la concentración de radioactividad deseada para estudios de biodistribución e imagen. De forma interesante, después de la neutralización y la evaporación del pico eluido, solamente un pico se aisló aproximadamente 14,3 min después de la reinyección del trazador en HPLC. Para verificar la isomerización de [⁸⁶Y]6, el compuesto 6 se radiomarcó con ⁸⁶Y con vehículo añadido, y la mezcla se analizó por HPLC. Se aisló solamente un pico a los 14,3 min. Para [⁸⁶Y]4-5, se aisló un solo pico radiomarcado. El T_r para [⁸⁶Y]4 fue de 14,0 min y el de 4 sin quelar fue de 15,5 min, mientras tanto, [⁸⁶Y]5, T_r = 16,9 min, y para el 5 sin quelar T_r = 19,5 min.

30 *Modelos animales y ensayos*: Las actividades inhibitoras de PSMA se determinaron usando un ensayo basado en fluorescencia (Banerjee, Pullambhatla, Byun, et al., 2011). Las constantes inhibitoras de enzimas (valores de K_i) se generaron usando la conversión de Cheng-Prusoff (Cheng y Prusoff, 1973). Se utilizaron sublíneas del xenoinjerto de cáncer de próstata humano PC-3 independiente de andrógenos (Banerjee, Pullambhatla, Byun, et al., 2011). Estas sublíneas se han modificado para expresar niveles altos (PIP PC-3) o producir naturalmente bajos niveles (gripe PS-3) de PSMA (Dr. Warren Heston, Clevely Clinic, Cleveland, OH).

Tanto las líneas celulares que expresan PSMA (PIP PC-3) como las que no tienen expresión (gripe PC-3) se cultivaron en medio RPMI 1640 (Invitrogen) que contenía suero fetal bovino al 10 % (FBS) (Invitrogen) y Pen-Strep a 1 % (Biofluids) como se ha descrito previamente (Banerjee, Pullambhatla, Byun, et al., 2011).

45 A ratones macho de seis a ocho semanas de edad, diabéticos no obesos (NOD)/con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) (Charles River Laboratories) se les implantaron por vía subcutánea (SC) células PIP PC-3 PSMA+ y de gripe PC-3 PSMA- (2 x 10⁶ en 100 µl de Matrigel) en el costado cefálico derecho e izquierdo, respectivamente. Los ratones se sometieron a pruebas de imagen o se usaron en ensayos de biodistribución cuando los xenoinjertos alcanzaron de 5 a 7 mm de diámetro.

50 Para el ensayo de biodistribución, a ratones NOD/SCID portadores de xenoinjerto de PIP PC-3 PSMA+ y gripe PC-3 PSMA- se les inyectó a través de la vena de la cola 0,55 MBq (15 µCi) de ⁸⁶Y-4 u ⁸⁶Y-6. En cada caso, cuatro ratones se sacrificaron por dislocación cervical 1 h, 2 h, 5 h y 24 h después de la inyección. El corazón, pulmones, hígado, estómago, páncreas, bazo, grasa, riñón, músculo, intestino delgado y grueso, vejiga urinaria y los tumores PIP PC-3 PSMA+ y de gripe PC-3 PSMA- se extrajeron rápidamente. También se extrajo una muestra de sangre de 0,1 ml. Se pesó cada órgano y se midió la radiactividad del tejido con un contador gamma automatizado (1282 Compugamma CS, Pharmacia/LKB Nuclear Inc.). El porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido (% de ID/g) se calculó utilizando una muestra diluida en serie de la actividad inyectada. Todas las mediciones de actividad se corrigieron para determinar la desintegración radiactiva hasta el momento de la inyección.

Obtención de imágenes de animales:

60 *PET y CT de animales pequeños*. Para los estudios de imagen, ratones NOD/SCID portadores de tumores PIP PC-3 PSMA+ y de gripe PC-3 PSMA- se anestesiaron con un 3 % y se mantuvieron bajo isoflurano al 1,5 % (v/v). A los ratones (n = 3 para ⁸⁶Y-4 u ⁸⁶Y-6 y n = 2 para ⁸⁶Y-5) se les inyectó a través de la vena de la cola 3,33-6,21 MBq (90-168 µCi) de trazador formulado en 100 µl de solución salina a pH ~7. Para los estudios de especificidad de unión, a un ratón se le administró por vía subcutánea con una dosis de bloqueador del inhibidor de PSMA conocido ácido N-[[[(S)-1-carboxi-3-metilbutil]amino]carbonil]-L-glutámico (ZJ43) (Olszewski et al., 2004) (50 mg/kg) a 30 min antes de la inyección de ⁸⁶Y-4, a otro ratón se le inyectó ⁸⁶Y-4 en solitario. En diferentes puntos de tiempo, se colocaron ratones

individuales anestesiados en la posición boca abajo sobre el caballete del escáner y se aseguraron con cinta médica mientras se aumentaba el caudal de anestesia a 0,8 l/min. Las imágenes se reconstruyeron utilizando el método FORE/2D-OSEM (dos iteraciones, 16 subconjuntos) y se incluyeron la corrección de la desintegración radiactiva, el tiempo muerto del escáner y la radiación dispersa. No se realizó corrección de volumen parcial (PVC). Después de cada exploración PET, se adquirió una CT para el registro conjunto anatómico. Para facilitar el registro conjunto de imágenes por PET y CT, se empleó un lecho especial para animales que se ajustó tanto al escáner PET como al de CT. Los animales estaban bajo anestesia e inmovilizados cuando se movían entre los escáneres, así como durante ambas exploraciones. Las imágenes PET y CT reconstruidas se registraron conjuntamente de forma manual a través de una transformación rígida, alineando puntos de referencia naturales (tal como las extremidades de los animales y el contorno del lecho) utilizando el software AMIDE (de sourceforge.net/amide). Los datos se visualizaron y se analizaron usando AMIDE.

Se adquirieron imágenes dinámicas de PET y CT de cuerpo entero en un PET de animales pequeños eXplore VISTA (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, RU) y un sistema SPECT/CT pequeño X-SPECT (Gamma Medica Ideas, Northridge, CA), respectivamente.

Imagen por PET con Papio anubis (babuino) de ⁸⁶Y-6. Se usó un *Papio anubis* macho (8 años, 27,1 kg) para estudiar la biodistribución de ⁸⁶Y-6. El babuino se colocó en posición supina durante la adquisición de imágenes. Para la corrección de la atenuación, se adquirió una imagen CT de baja dosis inmediatamente antes de la primera y la última imagen PET. Las imágenes PET y CT se registraron conjuntamente en puntos temporales utilizando una estación de trabajo Hermes (Hermes Medical Solutions, Greenville, SC). Catorce contornos de órganos de origen se delinearon en la CT con la ayuda de imágenes fusionadas de PET/CT. Se extrajeron las concentraciones de actividad media corregidas en desintegración (Bq/g) para cada órgano de origen de las imágenes PET. Se dibujaron contornos en las imágenes PET de los riñones, las cortezas renales y la próstata. La actividad total corregida en desintegración por órgano cuantificada dentro de las imágenes PET tuvo una correspondencia casi uno a uno con la radiactividad administrada durante los primeros seis puntos de tiempo (1 h o menos), lo que confirmó que la radiactividad administrada se contabilizó por completo en las imágenes PET, después de lo cual la cantidad total fue menor que la cantidad administrada debido a la micción. La cantidad total de radiactividad cuantificada en cada una de las imágenes PET se utilizó para obtener la cinética de retención de todo el cuerpo.

Se adquirieron nueve imágenes PET estáticas a los 5, 10, 15, 20, 35 min, 1, 2, 3, 5 y 23 h después de la administración intravenosa de 80,7 MBq (2,2 mCi) de ⁸⁶Y-6 en forma de un bolo. Las imágenes se adquirieron en modo 2D en un escáner Discovery Rx VCT (GE Healthcare).

Dosimetría de radiación: Para cada punto de tiempo, la concentración de actividad (en Bq/cm³) se midió en cada uno de los 14 órganos delineados y se multiplicó por el volumen del órgano para obtener la actividad total por punto de tiempo por órgano. Después, los valores medidos se corrigieron en desintegración y se dividieron por la masa de órgano de babuino, determinada por la densidad por CT y el volumen de los contornos dibujados, y la radioactividad inyectada para obtener la fracción de radioactividad inicial por gramo (FIA/g) para cada punto de tiempo y cada órgano. Los valores de FIA/g de babuino se convirtieron entonces en la FIA humana (por órgano) usando la siguiente ecuación (Schwartz et al., 2011; Woodard et al., 1975):

$$[FIA/\text{órgano}]_{\text{Humano}} = [FIA]_{\text{Babuino}} \cdot WB_{\text{masa}_{\text{Babuino}}} \cdot \frac{\text{masa}_{\text{órgano}_{\text{Humano}}}}{WB_{\text{masa}_{\text{Humano}}}} \quad (1)$$

donde $WB_{\text{masa}_{\text{Babuino}}} = 27,1 \text{ kg}$ y $WB_{\text{masa}_{\text{Humano}}} = 73,7 \text{ kg}$.

Este enfoque supone que la concentración de actividad en un tejido particular en relación con la concentración global en todo el cuerpo se conserva en todas las especies (es decir, la concentración de órgano/concentración corporal total es la misma para el babuino y el hombre). Los valores de la FIA humana resultantes se representaron en función del tiempo (nueve puntos de datos) para cada órgano y se ajustan a una expresión biexponencial:

$$FIA(t) = A1 \cdot e^{-(\lambda_{1\text{bio}} \cdot t)} + A2 \cdot e^{-(\lambda_{2\text{bio}} \cdot t)} \quad (2)$$

donde $A1$, $A2$, $\lambda_{1\text{bio}}$, y $\lambda_{2\text{bio}}$ son parámetros de ajuste. La suma de $A1$ y $A2$ proporciona la fracción en tiempo cero extrapolada de nuevo de la radioactividad administrada en cada órgano, y $\lambda_{1\text{bio}}$ y $\lambda_{2\text{bio}}$ son las constantes de depuración biológica. La ecuación para el coeficiente de actividad integrado en el tiempo [TIAC, previamente conocido como tiempo de residencia (Bolch et al., 2009) para cada órgano de origen se obtuvo, como su nombre implica, integrando la ecuación (2) e introduciendo un término de desintegración física, λ_{ϕ} , que depende del isótopo utilizado:

$$\tau(h) = \left(\frac{A1}{(\lambda_{1\text{bio}} + \lambda_{\phi})} + \frac{A2}{(\lambda_{2\text{bio}} + \lambda_{\phi})} \right) \quad (3)$$

Los TIAC se calcularon para ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu y ⁸⁶Y, con sus correspondientes constantes de desintegración física: ⁹⁰Y $\lambda_{\phi} =$

0,01083 h⁻¹ (T_{1/2} = 64,0 h); ¹⁷⁷Lu λ_φ = 0,00429 h⁻¹ (T_{1/2} = 161,52 h) y ⁸⁶Y λ_φ = 0,04702 h⁻¹ (T_{1/2} = 14,74 h), respectivamente debido a la micción. Las dosis absorbidas de radiación se obtuvieron al convertir la actividad integrada en el tiempo en dosis absorbidas según la metodología de fracción absorbida MIRD (Bolch et al., 2009) mediante el uso del software OLINDA/EXM (Stabin et al., 2005). El TIAC para la vejiga urinaria se obtuvo utilizando el modelo de vejiga MIRD implementado en OLINDA/EXM. La entrada a este modelo requiere el TIAC de todo el cuerpo, que se obtuvo de la ecuación $FIA(t) = A \cdot e^{(-\lambda_{bio} t)}$ ajustada a la cinética de retención de todo el cuerpo. El intervalo de micción se ajustó a 2 h. Los TIAC se introdujeron entonces en OLINDA/EXM (Stabin et al., 2005), y la dosis absorbida resultante por unidad de radioactividad se obtuvo para los 14 órganos. Se usó el modelo de riñón específico en OLINDA/EXM para obtener los valores de dosis de corteza renal. La dosis absorbida de los órganos externos al riñón se añadió a la dosis de corteza renal calculada a partir del modelo de riñón interno. El modelo específico de próstata se usó para la autodosis de próstata, y se añadió una dosis externa a la vejiga como un sustituto para la dosis de todo el cuerpo con respecto a la próstata. El componente de autodosis de la dosis absorbida por unidad de actividad para las glándulas salivales se obtuvo utilizando 3D-RD Monte Carlo (EGSnrc) y una CT humana con glándulas salivales delineadas. El componente de dosis cruzada se tomó asumiendo la misma dosis cruzada para un órgano de tamaño similar (páncreas).

Los valores de concentración de actividad medida (en Bq/cm³) por punto de tiempo por órgano se corrigieron en desintegración y se dividieron por la masa del órgano de babuino, determinada por la densidad por CT y el volumen de los contornos dibujados, y la radioactividad inyectada para obtener la fracción de radioactividad inicial por gramo (FIA/g) para cada punto de tiempo y cada órgano. Los valores de FIA/g de babuino se convirtieron entonces en la FIA humana (por órgano) usando la ecuación relacionada (Olszewski et al., 2004; Schwartz et al., 2011). Los valores de FIA humanos resultantes se representaron entonces en función del tiempo y se ajustaron a una expresión biexponencial y se calculó el valor del coeficiente de actividad integrado en el tiempo (TIAC, previamente conocido como tiempo de residencia (Woodard et al., 1975)) para cada órgano de origen. Las dosis absorbidas de radiación se obtuvieron al convertir la actividad integrada en el tiempo en dosis absorbidas según la metodología de fracción absorbida MIRD (Woodard et al., 1975) mediante el uso del software OLINDA/EXM (Bolch et al., 2009).

Los datos se expresaron como media ± desviación estándar (DE) calculados usando Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2010). Se usó el software Prism (GraphPAD) para determinar la significancia estadística al nivel de confianza del 95 %, considerando $P \leq 0,05$ significativo.

Resultados

Los compuestos **4** y **5** se prepararon usando una estrategia de síntesis peptídica de fase sólida y en solución combinadas como se muestra en los **Esquemas 4** y **5**. Los compuestos **1** y **4** se prepararon como se informó previamente (Banerjee, Pullambhatla, Byun, et al., 2011). La síntesis del ligando **5** conjugado con DOTA se realizó usando síntesis peptídica en fase sólida (SPPS) de fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) estándar, partiendo de la resina Fmoc-Lys(Boc)-Wang de acuerdo con el **Esquema 5**. Tres residuos de fenilalanina se acoplaron con la lisina unida a la resina seguido de la conjugación DOTA, después de lo cual el compuesto se escindió de la resina mediante una mezcla 1/1 de TFA/CH₂Cl₂ para producir **3** con un rendimiento moderado (~20 %). La ε-amina libre de lisina de **3** se conjugó entonces con **1** (Davis et al., 2009) para producir **5**. El compuesto **6** se sintetizó haciendo reaccionar DOTA-bencil-isocianato y N-Boc-1,4 diaminobutano comercialmente disponibles en DMSO en presencia de diisopropiltilamina a 40 °C durante 4 h, seguido de la eliminación del grupo Boc para producir **7** con un rendimiento moderado después de la purificación por HPLC. Después, el compuesto **7** se conjugó con **1** para producir **6** con buen rendimiento. Se prepararon complejos de itrio estable (⁸⁹Y) incubando los conjugados **4-6** con una solución acuosa de YNO₃ a 95 °C como se muestra en los **Esquemas 4-5**. Vale la pena mencionar que los compuestos **4-5** marcados con ^{86/89}Y(III) contienen tres ácidos carboxílicos coordinados con el metal, lo que lo convierte en un compuesto neutro en general, mientras que [^{86/89}Y]**6** tiene cuatro ácidos carboxílicos coordinados que producen un compuesto general con carga negativa. Los radiotrazadores [⁸⁶Y]**4-6** se prepararon usando un mismo procedimiento general, tras la reacción con [⁸⁶Y]NO₃ a concentraciones de ligando de 10⁻⁶ M en agua en ebullición durante 30 min a pH 5-6.

muestran en la figura 14. El radiomarcado de los compuestos objetivo se realizó con alto rendimiento (~90-97 %) y pureza radioquímica (>98 %) con alta radiactividad específica (>83,92 GBq/ μ mol (2,27 Ci/ μ mol)). Todos los compuestos mostraron una alta afinidad de unión, variando los valores de K_i de 0,10 a 4,69 nM (Tabla 2).

5

Tabla 2. Actividades inhibitoras de PSMA

	K_i [nM]	CI al 95 % de K_i
4	0,41	0,34-0,56
^{89}Y -4	0,36	0,2-0,51
5	3,12	1,7-5,60
^{89}Y -5	0,10	0,04-0,32
6	1,80	0,83-3,92
^{89}Y -6	2,99	1,91-4,69
ZJ43	1,16	0,08-2,26

Imágenes PET de animales pequeños: Se obtuvieron imágenes PET/CT de cuerpo entero para ^{86}Y -4, ^{86}Y -5 y ^{86}Y -6 (figura 18A, figura 18B, figura 18C, figura 19A, figura 20A, figura 20B y figura 20C). Los tres radiotrazadores permitieron la visualización de tumor PIP PC-3 PSMA+ y los riñones (figura 18A, figura 18B y figura 18C), un órgano conocido que expresa PSMA, 2 h después de la inyección. La captación renal de los radiotrazadores se debe parcialmente a la vía de excreción de estos agentes, así como a la captación específica de la expresión de PSMA en los túbulos renales proximales de ratón (Stabin et al., 2005). El agente ^{86}Y -5 demostró una acumulación no específica en el tracto gastrointestinal, presumiblemente debido al aumento de la hidrofobicidad de los tres residuos Phe en el resto enlazador. Las imágenes PET-CT de ^{86}Y -4 se adquirieron 1, 4 y 18 h después de la inyección considerando la corta semivida biológica de esta clase de compuestos de bajo peso molecular. Se observó la presencia del radiotrazador en el tumor PIP PC-3 PSMA+ y los riñones y la vejiga urinaria hasta 4 h (figura 19A). La radiactividad en la vejiga y los riñones se depuró significativamente a las 18 h, aunque el tumor PIP PC-3 PSMA+ retuvo algo de actividad. Como una prueba adicional de especificidad de unión *in vivo*, se realizó un estudio de bloqueo de ^{86}Y -4 pretratando al animal con 50 mg/kg del potente inhibidor selectivo de PSMA, **ZJ43** (Silver et al., 1997). La figura 19B demuestra que ZJ43 fue capaz de bloquear la unión de ^{86}Y -4 no solo dentro del tumor sino también dentro de la corteza renal, otro tejido que expresa PSMA (Stabin et al., 2005). Las figuras 20A, la figura 20B y la figura 20C muestra imágenes PET-CT para ^{86}Y -6 0,5, 2 y 12 h después de la inyección. De manera significativa, ^{86}Y -6 exhibió una depuración más rápida de la radioactividad de los tejidos normales y 12 h después de la inyección, la radioactividad se depuró en gran medida de los riñones, produciendo un claro contraste tumor-fondo. La delimitación clara del tumor PIP PC-3 PSMA+ se logró tan pronto como a los 15 min. En particular, ^{86}Y -6 no contiene los restos de fenilalanina adicionales de ^{86}Y -4 y ^{86}Y -5, y utiliza un quelante de ácido p-isotiocianatobencil 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), que añade un carboxilato adicional para retener fuertemente el metal y disminuye la lipofilicidad.

Biodistribución en ratones: Basándose en los resultados de las imágenes, los compuestos ^{86}Y -4 y ^{86}Y -6 se evaluaron adicionalmente en un ensayo de biodistribución estándar (Banerjee, Pullambhatla, Byun, et al., 2011). Las Tablas 3 y 4 muestran los valores de captación del % de ID/g en órganos seleccionados 1, 2, 5 y 24 h después de la inyección. Ambos radiotrazadores mostraron una unión dependiente de PSMA xenoinjertos de tumor PIP PC-3 PSMA+, demostrando ^{86}Y -4 una alta captación tumoral tan pronto como 1 h después de la inyección ($29,3 \pm 8,7$ % de ID/g) con una depuración relativamente lenta con respecto al $15,7 \pm 1,7$ % de ID/g en 5 h y con respecto al $5,9 \pm 0,8$ % de ID/g 24 h después de la inyección. Las relaciones de captación de tumor PIP PC-3 PSMA+ con respecto a tumor de gripe PC-3 PSMA- variaron de 89 a 1 h hasta un valor máximo de 229 en 24 h. La sangre y los tejidos normales tal como el corazón, hígado, estómago y páncreas no mostraron una captación significativa (~1 % de ID/g) y disminuyó por debajo del 0,02 % de ID/g después de 24 h. Las relaciones tumor PIP PC-3 PSMA+ con respecto al músculo también fueron altas, alcanzando un valor máximo de 1046 a las 24 h. La captación renal se encontró esperablemente alta y alcanzó su punto máximo al $244,9 \pm 8,8$ % de ID/g en 1 h y disminuyó al $1,5 \pm 0,7$ % de ID/g en 24 h.

La Tabla 4 muestra los valores de captación del % de ID/g del órgano para ^{86}Y -6. El compuesto ^{86}Y -6 se acumuló rápidamente dentro del tumor PIP PC-3 PSMA+ en 1 h después de la inyección, con un valor de captación del $26,6 \pm 1,9$ % de ID/g. La concentración del radiotrazador aumentó continuamente dentro del tumor PIP PC-3 PSMA+ para exhibir la captación más alta del $32,2 \pm 8,0$ % de ID/g 5 h después de la inyección. La captación tumoral se mantuvo alta hasta las 24 h posteriores a la inyección. Los órganos normales tal como la sangre, corazón, hígado, bazo, estómago y páncreas exhibieron una captación baja en 1 h, que disminuyó hasta por debajo del 0,4 % de ID/g en 5 h. La captación renal para ^{86}Y -6, $86,5 \pm 13,6$ % de ID/g y $54,0 \pm 9,2$ % de ID/g en 1 h y 2 h respectivamente, fue muy menor que para ^{86}Y -4.

50

Tabla 3. Biodistribución de ⁸⁶Y-4 en ratones (% de ID/g)

	1H	2H	5H	24H
sangre	0,5 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
corazón	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
pulmón	1,1 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0
hígado	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0
bazo	5,1 ± 1,4	1,3 ± 0,5	0,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0
riñón	245,0 ± 9,0	123,0 ± 48	23,0 ± 9,7	1,5 ± 0,7
músculo	0,5 ± 0,4	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0
intestino delgado	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
intestino grueso	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0
vejiga	1,5 ± 0,8	12,6 ± 12,5	3,6 ± 1	0,2 ± 0,2
PIP PC-3	29,0 ± 8,7	21,6 ± 3,6	15,7 ± 1,7	5,9 ± 0,8
gripe PC-3	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0
PIP : gripe	89	164	156	229
PIP : sangre	55	198	624	2.352
PIP : músculo	54	140	191	1.046

Tabla 4. Biodistribución de ⁸⁶Y-6 en ratones (% de ID/g)

	1H	2H	5H	24H
sangre	0,6 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0
corazón	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
pulmón	1,1 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
hígado	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
estómago	0,3 ± 0,1	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,05 ± 0,09
páncreas	0,3 ± 0,1	0,23 ± 0,2	0,08 ± 0,04	0,01 ± 0,01
bazo	3,0 ± 0,7	1,31 ± 0,7	0,36 ± 0,12	0,11 ± 0,05
grasa	0,6 ± 0,5	1,87 ± 3,44	0,12 ± 0,17	0,01 ± 0,01
riñón	87,0 ± 14,0	54,0 ± 9,0	15,6 ± 4,1	4,8 ± 0,8
músculo	0,8 ± 1,2	0,25 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
intestino delgado	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,07 ± 0,02	0,02 ± 0,02
intestino grueso	0,4 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0	0,0 ± 0,0
vejiga	6,0 ± 3,9	5,5 ± 3,7	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,3
PIP PC-3	26,6 ± 1,9	29,2 ± 2,3	32,2 ± 8,0	15,8 ± 6,4
gripe PC-3	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1
PIP:gripe	66	152	183	130
PIP:sangre	44	145	378	620
PIP:músculo	33	115	921	3.010

5 *Imagen PET en babuino y farmacocinética de ⁸⁶Y-6:* La figura 21A y la figura 21B representan el estudio PET, donde el radiotrazador se observa en el hígado, glándulas salivales, riñón y vejiga. Para la totalidad del riñón, la corteza renal

5 y la próstata, se dibujaron contornos en cada imagen PET para la cuantificación. Todos los órganos mostraron depuración biológica en dos fases (rápida y lenta). Los riñones tuvieron la mayor captación en aproximadamente 25 min después de la inyección (8 % de ID/g). El sesenta y ocho por ciento de la radioactividad observada en los riñones se depuró con una semivida biológica de aproximadamente 1 h (0,84 h) y la radioactividad restante se depuró con una semivida biológica de 16,6 h. La mayor parte (66 %) de la radioactividad en la corteza renal se depuró con una semivida biológica de 1,1 h y la radioactividad restante se depuró con una semivida biológica de aproximadamente 19 h. Se observaron una captación y retención significativas en el hígado y las glándulas salivales, aunque más leve en comparación con las exploraciones PET de pacientes sometidos a pruebas de imagen con agentes dirigidos a PSMA marcados con ⁶⁸Ga y ^{124/131}I-MIP-1095 (Zechmann et al., 2014). La Tabla 5 proporciona el resumen de la cinética de depuración biológica de todos los órganos. Los TIAC utilizados en los cálculos de dosis se enumeran en la Tabla 6.

Tabla 5. Parámetros farmacocinéticos ajustados con [⁸⁶Y]6

Órganos	Parámetros ajustados		Semivida (h)
		(% de ID)	
Riñones	A1	6,36	0,84
	A2	2,98	16,62
Corteza renal	A1	4,23	1,10
	A2	2,16	19,19
Cerebro	A1	0,53	0,71
	A2	0,11	8,71
Pulmones	A1	2,78	0,42
	A2	1,27	6,29
Corazón	A1	1,55	0,29
	A2	0,29	6,49
Hígado	A1	4,77	0,38
	A2	1,52	7,71
Estómago	A1	0,15	0,46
	A2	0,09	6,14
Bazo	A1	0,12	1,49
	A2	0,04	18,74
Intestino delgado	A1	0,24	0,26
	A2	0,10	10,17
Intestino grueso	A1	0,45	0,25
	A2	0,30	5,97
Músculo	A1	14,98	1,98
	A2	0,56	69,31
Páncreas	A1	0,24	0,66
	A2	0,05	10,60
Retención de WB	A1	100,00	5,62
Glándulas salivales	A1	0,30	1,56
	A2	0,08	4,47
Próstata	A1	0,02	0,67
	A2	0,02	5,58

15

Tabla 6. Coeficientes de actividad integrados en el tiempo (tiempo de residencia)

Órganos de origen	Coeficiente de actividad integrado en el tiempo (MBq-h/MBq)		
	⁸⁶ Y	¹⁷⁷ Lu	⁹⁰ Y
	Cerebro	1,41E-02	1,89E-02
Intestino delgado	9,31E-03	1,43E-02	1,32E-02
Estómago	6,44E-03	8,46E-03	8,06E-03
ULI	1,99E-02	2,64E-02	2,51E-02
Contenido del corazón	2,55E-02	3,30E-02	3,15E-02

Órganos de origen	Coeficiente de actividad integrado en el tiempo (MBq-h/MBq)		
	⁸⁶ Y	¹⁷⁷ Lu	⁹⁰ Y
Riñones	4,08E-01	7,24E-01	6,43E-01
Corteza renal	3,23E-01	6,02E-01	5,27E-01
Hígado	1,37E-01	1,88E-01	1,77E-01
Pulmones	9,70E-02	1,28E-01	1,22E-01
Músculo	4,76E-01	8,15E-01	6,85E-01
Páncreas	6,37E-03	9,00E-03	8,42E-03
Bazo	7,41E-03	1,29E-02	1,15E-02
Contenido de vejiga ur.	7,41E-01	1,00	9,54E-01
Próstata	1,15E-03	1,48E-03	1,42E-03
Glándulas salivales	4,45E-02	4,97E-02	4,88E-02
Resto	3,64	4,84	4,74

Dosis absorbidas por los órganos: La Tabla 7 proporciona una lista detallada de las dosis absorbidas por los órganos, expresadas en unidades de mGy/MBq, para ⁸⁶Y, ⁹⁰Y/¹⁷⁷Lu. Para todos los isótopos, la corteza renal recibió la dosis absorbida más alta por actividad unitaria. Por consiguiente, es probable que la corteza renal sea el órgano limitante de la dosis para los radiometales terapéuticos en el contexto de la planificación del tratamiento de dosis absorbida específica del paciente (Baechler et al., 2012; Hobbs et al., 2009), seguido de la vejiga. Para el isótopo de diagnóstico ⁸⁶Y, también se calculó una dosis eficaz de 0,099 mSv/MBq en OLINDA/EXM.

Tabla 7. Dosis absorbidas por los órganos en el macho adulto de referencia basado en datos de imágenes PET de babuino

Órganos objetivo	Dosis de los órganos (mGy/MBq)		
	⁸⁶ Y	¹⁷⁷ Lu	⁹⁰ Y
Suprarrenales	8,62E-02	6,96E-03	3,46E-02
Cerebro	2,30E-02	1,48E-03	6,79E-03
Mamas	4,52E-02	6,08E-03	3,46E-02
Pared de la vesícula biliar	7,88E-02	6,79E-03	3,46E-02
Pared del LLI	9,61E-02	7,06E-03	3,46E-02
Intestino delgado	8,72E-02	8,30E-03	4,29E-02
Pared del estómago	6,69E-02	7,88E-03	3,46E-02
Pared del ULI	8,56E-02	1,16E-02	6,29E-02
Pared del corazón	6,70E-02	9,54E-03	5,33E-02
Riñones	4,03E-01	2,10E-01	1,13
Corteza renal	4,24E-01	2,45E-01	1,19
Hígado	7,19E-02	9,37E-03	4,99E-02
Pulmones	5,98E-02	1,16E-02	6,57E-02
Músculo	5,47E-02	3,26E-03	1,32E-02
Ovarios	9,48E-02	7,05E-03	3,46E-02
Páncreas	8,09E-02	9,34E-03	4,64E-02
Médula roja	6,29E-02	5,04E-03	2,41E-02
Células osteogénicas	7,19E-02	1,94E-02	5,26E-02
Piel	3,97E-02	6,01E-03	3,46E-02
Bazo	7,23E-02	7,16E-03	1,64E-02

Órganos objetivo	Dosis de los órganos (mGy/MBq)		
	⁸⁶ Y	¹⁷⁷ Lu	⁹⁰ Y
Testículos	7,23E-02	6,56E-03	3,46E-02
Timo	5,38E-02	6,29E-03	3,46E-02
Tiroides	5,07E-02	6,26E-03	3,46E-02
Pared de la vejiga urinaria	6,17E-01	2,14E-01	1,25
Útero	1,34E-01	7,76E-03	3,46E-02
Próstata	7,64E-02	7,94E-03	4,78E-02
Glándulas salivales	1,78E-01	4,76E-02	2,79E-01

Análisis

Se han sintetizado y evaluado tres agentes dirigidos a PSMA marcados con ⁸⁶Y para evaluar la dosimetría de primates no humanos. Estos compuestos contienen un radiometal quelado con DOTA monoamida o DOTA unido a la urea dirigida similar a otros que se han publicado (Banerjee et al., 2010; Banerjee, Pullambhatla, Byun, et al., 2011). DOTA y sus derivados han sido el centro de atención porque pueden usarse tanto para PET (⁸⁶Y) como para terapia radiofarmacéutica (⁹⁰Y). Se ha documentado que la farmacocinética depende del quelante de radiometal utilizado, incluidos aquellos para compuestos diseñados específicamente para unirse a PSMA. Sin desear quedar ligado a teoría alguna concreta, se cree que se atribuye principalmente a la carga general del radioligando y la estabilidad de los complejos de quelatos metálicos. Específicamente, en un informe anterior de agentes conjugados DOTA de unión a PSMA marcados con ⁶⁸Ga, ⁶⁸Ga-4 demostró la depuración más rápida de los tejidos normales, incluidos los riñones (Banerjee et al., 2010). Sin embargo, en el estudio actual se observó que ⁸⁶Y-4 exhibió una captación renal inesperadamente mayor. La evaluación de ⁸⁶Y-6 demostró la captación renal más baja deseada y la mayor retención tumoral requerida para la radioterapia y posteriormente se seleccionó para imágenes PET cuantitativas en un babuino para mediciones de dosimetría.

El estudio de especificidad de unión (figura 19B) indicó que en 1 hora casi toda la unión renal de ⁸⁶Y-4 era específica en lugar de debido a la excreción. La evidencia sugiere que un flujo sanguíneo más organizado y rápido en el parénquima renal en comparación con los tumores puede explicar la mayor retención tumoral en lugar de la retención renal para muchos de estos agentes. Si bien la afinidad de unión a PSMA es un factor que probablemente determina la captación tumoral frente a la renal, otros factores, tal como la lipofiliencia, carga, unión a proteínas plasmáticas y peso molecular, probablemente también desempeñan un papel importante. Las dosis estimadas de la corteza renal de 1,19 mGy/MBq para ⁹⁰Y y 0,245 mGy/MBq para ¹⁷⁷Lu se comparan favorablemente con los valores de 1,97 mGy/MBq para ⁹⁰Y y 0,45 mGy/MBq para ¹⁷⁷Lu calculados en un informe que implica radioterapia de receptores peptídicos (Baechler et al., 2012), donde la corteza renal era el órgano limitante de la dosis.

El agente quelante DOTA comúnmente utilizado e implementado clínicamente se usó para los tres radioligandos porque, se sabe que DOTA, y muchos derivados de DOTA, forman complejos cinética y termodinámicamente estables. El complejo de Y(III) correspondiente ha demostrado ser en muchos casos estable *in vivo*, un rasgo deseable para un quelante. De manera significativa, también se informa que DOTA forma complejos estables con una serie de iones metálicos trivalentes que incluyen lantánidos, por ejemplo, ¹⁷⁷Lu(III), y actínidos, por ejemplo, ²²⁵Ac(III), que son químicamente dispares a ⁸⁶Y(III). Además, los agentes basados en urea de unión a PSMA son estables en las condiciones de radiomarcado empleadas para DOTA.

Recientemente, las versiones marcadas con ⁹⁰Y o ¹⁷⁷Lu del anticuerpo monoclonal dirigido a PSMA J591 demostraron resultados prometedores en ensayos clínicos de fase I y II (Bander et al., 2005; Tagawa, Akhtar, et al., 2013; Tagawa, Milowsky, et al., 2013). En estos casos, se usó anticuerpo marcado con ¹¹¹In para los cálculos de dosimetría (Vallabhajosula et al., 2005). Aunque esos anticuerpos monoclonales radiomarcados tienen potencial para la detección y terapia de tumores, su modesto direccionamiento tumoral y una dosis absorbida relativamente alta para la médula roja mitigan el uso clínico rutinario. Como un enfoque alternativo, los resultados clínicos tempranos utilizando pequeñas moléculas a base de urea dirigidas a PSMA marcadas con ¹³¹I mostraron una alta dosis de administración a focos neoplásicos (Zechmann et al., 2014). En estos estudios publicados, las glándulas salivales mostraron las dosis absorbidas más altas (4,62 mGy/MBq) seguidas de tanto el hígado (1,47 mGy/MBq) como los riñones (1,45 mGy/MBq) (Zechmann et al., 2014). Es probable que un contribuyente significativo a la dosis absorbida por las glándulas salivales sea la captación de yodo libre, como también lo demuestra la dosis relativamente alta (0,91 mGy/MBq) absorbida por la tiroides, que no tiene lugar en el estudio actual. En general, las tasas de depuración de los órganos normales son más rápidas para ⁸⁶Y-6 que para los resultados publicados (Zechmann et al., 2014), con la excepción de los riñones.

En resumen, los resultados de biodistribución y dosimetría sugieren que ⁸⁶Y-6 es un candidato prometedor para la

obtención de imágenes PET cuantitativas de tumores que expresan PSMA, y pueden proporcionar un sustituto de imagen adecuado para la planificación y monitorización de la terapia radiofarmacéutica a base de ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu dirigida a PSMA.

5 EJEMPLO DE REFERENCIA 4

¹⁷⁷Lu-SR-VI-71, ²⁰³Pb-SR-VI-71 y ²⁰³Pb-SR-IX-11 para la terapia con radionucleidos dirigida a PSMA

10 La figura 24, un estudio de captación celular usando 0,01-10 µCi de ¹⁷⁷Lu-SRVI71, demostró una alta captación en PIP PSMA+ y una captación insignificante en tumor de gripe PSMA-. Además, el estudio de internalización reveló que ~44 % de la radiactividad asociada a células total se internalizó. Además, se observó un bloqueo de ~90 % en células PSMA+ tras la incubación conjunta de 10 µM de ácido N-[[[(1S)-1-carboxi-3-metilbutil]amino]carbonil]-L-glutámico (ZJ43), un inhibidor específico de PSMA que confirma además la excelente especificidad del agente (figura 23). La evaluación *in vivo* se realizó en xenoinjertos de ratón PIP PSMA+ y de gripe PSMA- estándar y realizando imágenes SPECT con un VECT o instrumento con un colimador de ratón de sensibilidad ultra alta adicional como se describe en la figura 25A, la figura 25B y la figura 25C. La mayor acumulación de radiactividad se encontró en el tumor PIP PSMA+ en todos los puntos de tiempo. Otros órganos visibles son los riñones y la vejiga. Los estudios de biodistribución a las 2 h (59,1 ± 12,8 % de ID/g) y a las 24 h (40,6 ± 5,8 de ID/g) (n = 4) revelaron de hecho una alta captación y retención en el tumor PSMA+ con alta especificidad (PIP:gripe en ~180 a las 2 h). La captación renal inicial fue alta, 89,3 ± 28,9 % a las 2 h, seguido de una depuración rápida en 24 h (6,29 ± 3,4 % de ID/g).

15

20

Tabla 8. Biodistribución tisular de ¹⁷⁷Lu-SR-VI-71

	3 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Sangre	0,14 ± 0,04	0,03 ± 0,03	0,03 ± 0,03	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00
corazón	0,09 ± 0,04	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,00
pulmón	0,62 ± 0,31	0,25 ± 0,026	0,06 ± 0,04	0,03 ± 0,02	0,05 ± 0,01
hígado	0,31 ± 0,25	0,38 ± 0,35	0,11 ± 0,07	0,05 ± 0,03	0,04 ± 0,0
bazo	1,83 ± 0,38	0,74 ± 0,64	0,17 ± 0,05	0,09 ± 0,08	0,06 ± 0,03
riñón	53,66 ± 9,64	4,35 ± 0,41	2,35 ± 0,62	2,59 ± 1,10	1,44 ± 0,11
músculo	0,24 ± 0,14	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,0
SI	0,23 ± 0,12	0,10 ± 0,05	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,03	0,01 ± 0,00
glándula salival	0,42 ± 0,09	0,07 ± 0,08	0,10 ± 0,04	0,09 ± 0,04	0,06 ± 0,02
PIP	41,46 ± 7,88	27,52 ± 1,19	16,99 ± 2,65	15,63 ± 4,62	9,04 ± 1,72
Gripe	0,14 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,0

Tabla 9. Biodistribución tisular de ²⁰³Pb-SR-VI-71

	1 H	2 H	4 H	24 H
Sangre	0,60 ± 0,05	0,31 ± 0,04	0,24 ± 0,02	0,21 ± 0,02
corazón	0,30 ± 0,03	0,14 ± 0,06	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,01
pulmón	1,20 ± 0,19	0,64 ± 0,14	0,28 ± 0,04	0,16 ± 0,01
hígado	1,09 ± 0,07	1,01 ± 0,21	0,92 ± 0,09	0,64 ± 0,04
estómago	0,30 ± 0,04	0,15 ± 0,03	0,13 ± 0,03	0,07 ± 0,01
páncreas	0,49 ± 0,09	0,29 ± 0,05	0,24 ± 0,05	0,09 ± 0,06
bazo	5,07 ± 1,68	1,59 ± 0,58	0,72 ± 0,16	0,24 ± 0,02
grasa	0,77 ± 0,29	0,31 ± 0,22	0,31 ± 0,18	0,05 ± 0,06
riñón	75,18 ± 9,94	39,35 ± 7,28	22,75 ± 6,22	7,01 ± 0,80
músculo	0,22 ± 0,14	0,22 ± 0,07	0,06 ± 0,02	0,04 ± 0,03
Intestino delgado	0,31 ± 0,05	0,23 ± 0,04	0,15 ± 0,04	0,04 ± 0,03

	1 H	2 H	4 H	24 H
glándula salival	1,78 ± 0,69	0,93 ± 0,07	0,29 ± 0,02	0,10 ± 0,05
vejiga	5,96 ± 2,24	10,40 ± 3,21	1,94 ± 0,49	0,31 ± 0,16
PIP PC-3	41,88 ± 7,60	38,14 ± 6,30	34,74 ± 7,37	27,92 ± 7,01
gripe PC-3	0,43 ± 0,11	0,29 ± 0,14	0,20 ± 0,06	0,14 ± 0,01
PIP/gripe	98	130	178	194

Tabla 10. Biodistribución tisular de $^{203}\text{Pb-SR-IX-11}$ (n = 2) y $^{203}\text{Pb-SR-VI-71}$ (n = 4) en 2 h

	$^{203}\text{Pb-SR-IX-11}$	$^{203}\text{Pb-SR-VI-71}$
Sangre	0,07 ± 0,01	0,31 ± 0,04
corazón	0,07 ± 0,01	0,14 ± 0,06
pulmón	0,24 ± 0,03	0,64 ± 0,14
hígado	0,21 ± 0,01	1,01 ± 0,21
estómago	0,12 ± 0,00	0,15 ± 0,03
páncreas	0,06 ± 0,00	0,29 ± 0,05
bazo	0,25 ± 0,1	1,59 ± 0,58
grasa	1,54 ± 1,64	0,31 ± 0,22
riñón	3,61 ± 0,81	39,35 ± 7,28
músculo	0,78 ± 0,83	0,22 ± 0,07
intestino delgado	0,25 ± 0,15	0,23 ± 0,04
glándula salival	0,35 ± 0,10	0,93 ± 0,07
vejiga	8,64 ± 0,77	10,40 ± 3,21
PIP PC-3	21,64 ± 1,23	38,14 ± 6,30
gripe PC-3	0,19 ± 0,04	0,29 ± 0,14
PIP: gripe	114	130

- 5 Estos resultados son bastante prometedores con respecto a la viabilidad para preparar dichos agentes teranósticos de bajo peso molecular con la farmacocinética deseada para la terapia con radionúclidos. Los datos respaldan adicionalmente que esta clase de agentes de LMW puede internalizarse eficazmente tras unirse con PSMA.

EJEMPLO DE REFERENCIA 5

- 10 Síntesis y uso de ZCP-01 y agentes relacionados para la terapia con radionúclidos dirigida a PSMA

Descripción general

- 15 La preparación y uso de ureas de unión a PSMA conjugadas con radiometales quelados a través de diversos grupos de enlace para obtener imágenes y posible radioterapia de tumores que expresan PSMA se han descrito en varias patentes y publicaciones (Banerjee, et al., 2008; Banerjee, et al., 2010; Banerjee, et al., 2011; Banerjee, et al., Oncotarget 2011; Banerjee, et al., 2013; Banerjee, et al., 2014), así como en la presente solicitud de patente. Los inhibidores de PSMA basados en nuevos andamios de lisina-carbamato, ácido oxipentanodioico (OPA) correspondiente a un andamio de carbamato y ácido amino-pentanodioico (NPA) correspondiente a un andamio de
- 20 carbamato "inverso", incluidos los análogos marcados con F-18, como se divulga en la figura 29, se han desarrollado recientemente. Los compuestos de NPA y OPA marcados con F-18 demostraron una captación selectiva en xenoinjertos de ratón con tumor PSMA positivo.

- 25 **ZCP-01**, un carbamato de lisina OPA ligado a DOTA-PEG para formar complejos de radiometales para formación de imágenes y radioterapia de tumores y tejidos PSMA positivos, se ha sintetizado como ejemplo. Una amplia gama de ligandos quelantes metálicos y enlazadores divulgados previamente en las Solicitudes de Patente N.º WO 2009/002529 A2 y WO2010/108125A2 para su uso con ureas, se pueden unir a los andamios OPA y NPA para

proporcionar nuevos agentes radiomarcados para obtención de imágenes y/o radioterapia del cáncer de prostata.

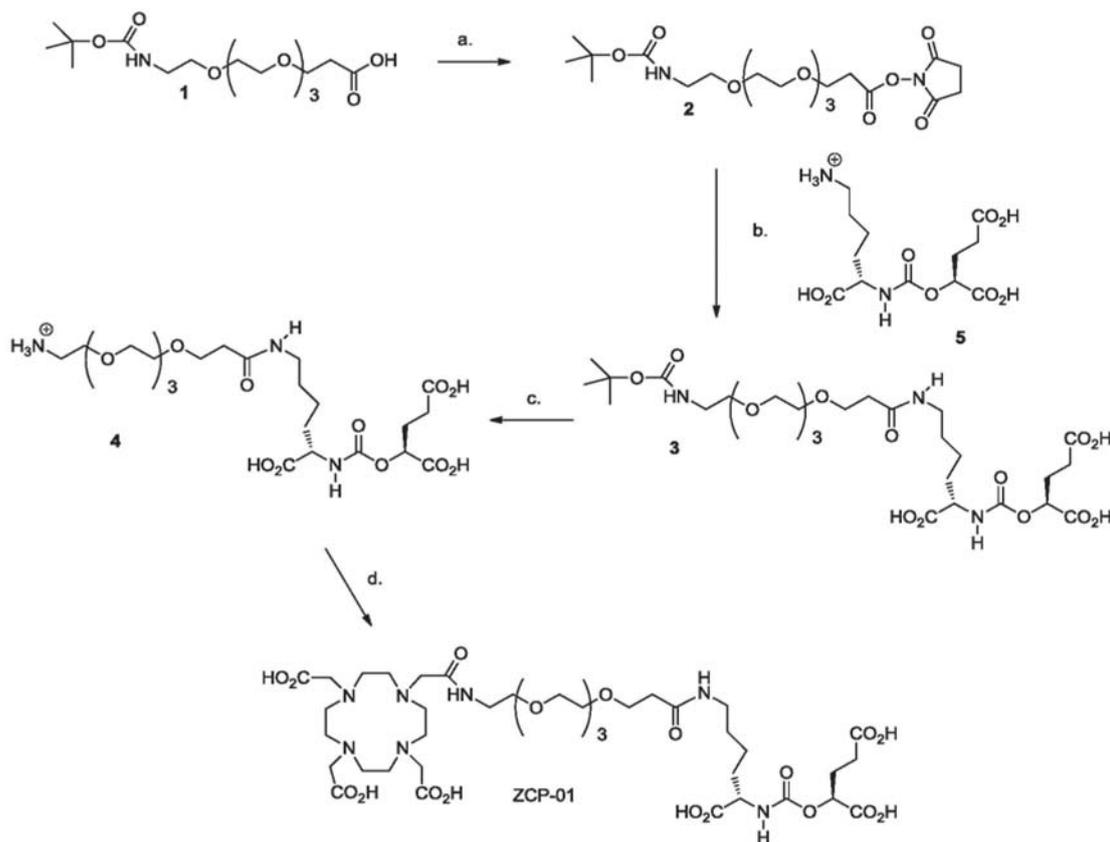
Material y métodos

5 **Ácido (18S,22S)-2,12,20-trioxo-1-(4,7,10-tris(carboximetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1-il)-6,9,21-trioxa-3,13,19-triazatetracosan-18,22,24-tricarboxílico, ZCP-01.** Haciendo referencia al esquema 7, a una solución del compuesto **4** (8,5 mg, 0,015 mmol en 200 μ l DMSO) se le añadió diisopropiletil amina (27 μ l, 0,255 mmol) y seguido de la adición lenta de DOTA-NHS (15,2 mg, 0,023 mmol, en 200 μ l DMSO) y la solución resultante se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. La solución después se diluyó con agua y se purificó por HPLC. Método de HPLC: Phenomenex C₁₈ Luna, 10 mm*250 mm, caudal: 8 ml/min, λ : 200 nm, 220 nm, disolvente H₂O y CH₃CN (TFA al 0,1 % cada vez). Un método de gradiente; 0-20 min, 100/0 de H₂O/CH₃CN a 80/20 de H₂O/CH₃CN; 20-30 min de 80/20 de H₂O/CH₃CN a 0/100 de H₂O/CH₃CN; 31 min de 100/0 de H₂O/CH₃CN. Tiempo de retención de HPLC (t_r) = 16 min. ESI-MS: 954 (M+H). Rendimiento: 9,4 mg después de la purificación por HPLC (~65,7 %).

15 **Preparación de ^{113/115}In-ZPC-01** A una solución de ZPC-01 (5 mg, 5,24 μ mol en 500 μ l de NaOAc 0,5 M, pH 6,8) se le añadieron 50 μ l de InNO₃ (0,5 M), y la mezcla (pH 6) se incubó durante 30 min a 90 °C. Se añadió una solución de EDTA (200 μ l, 30 mM, pH 6,0), y la mezcla de reacción se incubó durante 10 min a 40 °C para formar un complejo de indio (III) sin reaccionar. El compuesto resultante se purificó por HPLC (igual que ZPC-01), se concentró por evaporación y se liofilizó. ESI-MS:1066 [M+H]⁺. Calculado para C₃₉H₆₄InN₇O₂₀, 1065,79.

20 **Preparación de ¹¹¹In-ZPC-01.** Se añadió 1,0 μ l de ¹¹¹InCl₃ (1 mCi) en HCl 0,1 N a 20 μ l de Ourea-PEG- DOTA 1 mM en NaOAc 0,2 M. El pH de la mezcla fue ~4,0. Después, 20 μ l de NaOAc 0,2 M para ajustar el pH a ~6. La mezcla se mantuvo a 50 °C durante una hora y se purificó por radio-HPLC usando un método isocrático que contenía una fase móvil de agua al 90 % (que contenía TFA al 0,1 %) y CH₃CN al 10 % (TFA al 0,1 %); Caudal: 1,0 ml/min; λ : 200 nm, y una columna C₁₈ (25 x 4,6 mm), Varian microsob-MV 100-5. [¹¹¹In]ZPC-01 radiomarcado se eluyó a 14,9 min mientras se eluyó un agente quelante sin marcar en 32 min.

Esquema 7



30

a. DCC, N-hidroxisuccinimida, CH₂Cl₂; b. diisopropiletilamina, DMSO; TFA/agua; d. DO3A-NHS (disponible comercialmente en Macrocylics)

Resultados

ZCP-01 y [In]-ZCP-01 mostraron alta afinidad de unión, con valores de Ki que variaban de 17,82 nM a 58,21 nM y de 0,29 µM a 0,92 µM respectivamente (Tabla 8).

5

Tabla 11. Datos de inhibición de PSMA para ZCP-01 y [In]-ZCP-01

	In-ZCP-01	ZCP-01	ZJ43
EC50	89 nM-291 nM	1,43 µM-4,62 µM	0,99 nM - 2,40 nM
KI	17,82 nM a 58,21 nM	0,29 µM a 0,92 µM	0,20 nM a 0,48 nM
Intervalos de confianza al 95 %	0,96	0,97	0,97

Las imágenes por SPECT *in vivo* de [In]-ZCP-01 se realizaron en ratones portadores de xenoinjertos de tumor de PIP PC3 PSMA+ y gripe PC3 PSMA- implantados por vía subcutánea en el costado derecho e izquierdo, respectivamente, después de la inyección intravenosa de [¹¹¹In]-ZCP-01 como se muestra en la figura 34A, la figura 34B y la figura 34C. Sin embargo, [¹¹¹In]-ZCP-01 permite la visualización de tumor PIP PC3 PSMA+ y los riñones, un órgano que expresa PSMA conocido, 2 h y 4 h después de la inyección, mientras que el tumor de gripe recibió una captación no específica. 24 h después de la inyección, la radioactividad se depuró en gran medida del tumor y los riñones.

10

Estos resultados son bastante prometedores con respecto a la viabilidad de preparar dichos agentes teranósticos de bajo peso molecular con la farmacocinética deseada para la obtención de imágenes y la radioterapia de tumores.

15

REFERENCIAS

Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en la memoria descriptivas son indicativas del nivel de los expertos en la técnica a los que pertenece la materia objeto actualmente divulgada. Se entenderá que, aunque se hace referencia a una serie de solicitudes de patente, patentes y otras referencias en el presente documento, dicha referencia no constituye una admisión de que alguno de estos documentos forme parte del conocimiento general común en la técnica.

25

Publicación de Solicitud de Patente Internacional PCT N.º PCT/US2008/007947 de Pomper, M.G., Ray, S., Mease, R.C., Foss, C. for Labeled inhibitors of prostate specific membrane antigen (PSMA), biological evaluation, and use as imaging agents, published 2008/12/31 (WO 2009/002529 A2).

30

Publicación de Solicitud de Patente Internacional PCT N.º PCT/US2010/028020 de Pomper, M.G., Mease, R.C.; Ray, S., Chen, Y. for PSMA-targeting compounds and uses thereof, published 2010/09/23 (WO2010/108125 A2).

Publicación de Solicitud de Patente Internacional PCT N.º PCT/US2008/013158 to Chandran, S.S., Ray, S., Denmeade, S.R., Pomper, M.G., Mease, R.C. for Prostate specific membrane antigen (PSMA) targeted nanoparticles for therapy of prostate cancer, published 2009/06/04 (WO2009/070302 A1).

35

Aime, S., et al. *Curr Pharm Biotechnol* 2004, 5, 509-518.

Artemov, D. Molecular magnetic resonance imaging with targeted contrast agents. *J. Cell. Biochem.* Oct 15 2003;90(3):518-524.

Artemov, D., Mori N., Okollie, B., Bhujwalla, Z. M. *Magn Reson Med* 2003, 49, 403-408.

Artemov, D., Mori N., Ravi, R., Bhujwalla, Z. M. *Cancer Res* 2003, 63, 2723-2727.

40

Babich, J.W., Zimmerman, C., Joyal, J., Lu, G. Radiolabeled prostate specific membrane antigen inhibitors. US 2013/0034494 A1.

Baechler, S., et al. Three-dimensional radiobiological dosimetry of kidneys for treatment planning in peptide receptor radionuclide therapy. *Med. Phys.* 2012;39:6118-6128.

45

Bander, N.H., et al. Phase I trial of 177lutetium-labeled J591, a monoclonal antibody to prostate-specific membrane antigen, in patients with androgen-independent prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* 2005;23:4591-4601.

Banerjee, S.R., et al. Synthesis and evaluation of technetium-99m- and rhenium-labeled inhibitors of the prostate-specific membrane antigen (PSMA). *J. Med. Chem.* 2008;51:4504-4517.

Banerjee, S.R., Pullambhatla, M., Byun, Y., et al. 68Ga-labeled inhibitors of prostate-specific membrane antigen (PSMA) for imaging prostate cancer. *J. Med. Chem.* 2010;53:5333-5341.

50

Banerjee, S.R., Pullambhatla, M., Shallal, H., et al. Sequential SPECT and Optical Imaging of Experimental Models of Prostate Cancer with a Dual Modality Inhibitor of the Prostate-Specific Membrane Antigen. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* Sep 19 2011;50(39):9167-9170.

Banerjee, S.R., et al. A modular strategy to prepare multivalent inhibitors of prostate-specific membrane antigen (PSMA). *Oncotarget.* 2011;2:1244-1253.

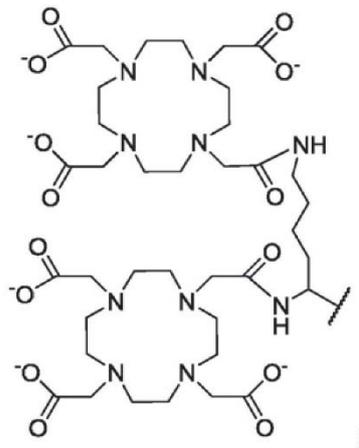
55

Banerjee, S.R., Pullambhatla, M., Foss, C.A., Falk, A., Byun, Y., Nimmagadda, S., Mease, R.C., Pomper, M.G. Effect of chelators on the pharmacokinetics of 99mTc-labeled imaging agents for the prostate-specific membrane antigen (PSMA). *J. Med. Chem.* 2013; 56: 6108-6121.

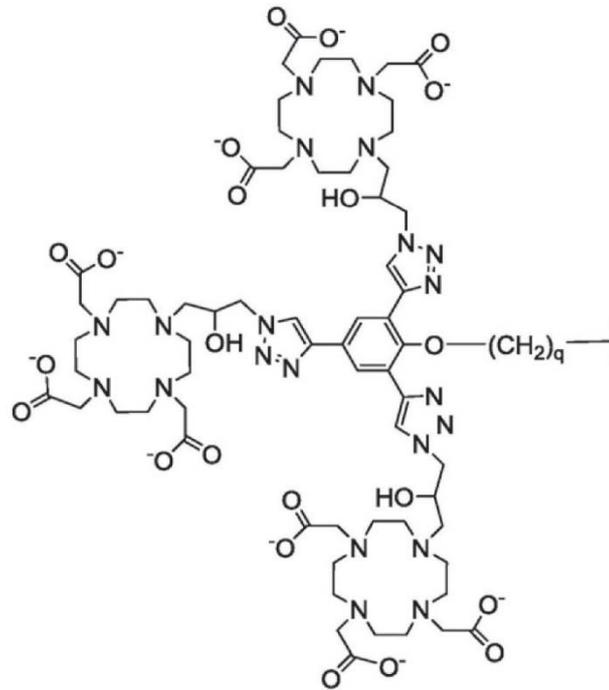
Banerjee, S.R., Pullambhatla, M., Foss, C.A., Nimmagadda, S., Ferdani, R., Anderson, C.J., Mease, R.C., Pomper,

- M.G. 64Cu-Labeled inhibitors of prostate-specific membrane antigen for PET imaging of prostate cancer. *J. Med. Chem.* 2014; 57: 2657-2669.
- Banerjee, S. R., Foss, C. A., Pullambhatla, M., Wang, Y., Srinivasan, S. R. F. K. E. Hobbs, M. Baidoo, R. C. Brechbiel, Mease, G. Sgouros, M. G. Pomper, Preclinical evaluation of 86Y-labeled inhibitors of prostate specific membrane antigen for dosimetry estimates. *J Nucl Med* 2015.
- 5 Baur, B., et al. Synthesis, radiolabelling and *in vitro* characterization of the Gallium-68-, Yttrium-90- and Lutetium-177-labelled PSMA ligand, CHX-A"-DTPA-DUPA-Pep. *Pharmaceuticals*. 2014;7:517-529.
- Behnam Azad, B., et al. *Nanoscale* 2015, 7, 4432-4442.
- Bodei, L., et al. Receptor radionuclide therapy with 90Y-[DOTA]0-Tyr3-octreotide (90Y-DOTATOC) in neuroendocrine tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2004;31:1038-1046.
- 10 Bolch, W.E., et al., MIRDO pamphlet No.21: a generalized schema for radiopharmaceutical dosimetry--standardization of nomenclature. *J. Nucl. Med.* 2009;50:477-484.
- Boros, E., et al. *J Am Chem Soc* 2012, 134, 19858-19868.
- Caravan, P., et al. *Inorg Chem* 2007, 46, 6632-6639.
- 15 Caravan, P., et al. *Contrast Media Mol Imaging* 2009, 4, 89-100.
- Chandran, S.S., et al., Characterization of a targeted nanoparticle functionalized with a urea-based inhibitor of prostate-specific membrane antigen (PSMA). *Cancer Biol. Therapy*. 2008;7:974-982.
- Chappell, L.L. et al. Synthesis, characterization, and evaluation of a novel bifunctional chelating agent for the lead isotopes 203Pb and 212Pb, *Nucl Med Biol*, 27 (2000) 93-100.
- 20 Chen, Z., Penet, et al. PSMA-targeted theranostic nanoplex for prostate cancer therapy. *ACS Nano*. 2012;6:7752-7762.
- Cheng, Y. and Prusoff, W.H. Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (150) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 1973;22:3099-3108.
- 25 Cho, S.Y. et al. Biodistribution, tumor detection, and radiation dosimetry of 18F-DCFBC, a low-molecular-weight inhibitor of prostate-specific membrane antigen, in patients with metastatic prostate cancer. *J. Nucl. Med.* 2012;53:1883-1891.
- Davis, S.L., et al. Bacterial thymidine kinase as a non-invasive imaging reporter for *Mycobacterium tuberculosis* in live animals. *PloS one* 2009; 4:e6297.
- De Leon-Rodriguez, L.M., et al. MRI detection of VEGFR2 *in vivo* using a low molecular weight peptoid-(Gd)8-dendron for targeting. *J. Am. Chem. Soc.* Sep 22 2010;132(37):12829-12831.
- 30 Evans, M. J., et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011, 108, 9578-9582.
- Frenzel, T., et al. *Invest Radiol* 2008, 43, 817-828.
- Geninatti-Crich, S. *Contrast Media Mol Imaging* 2011, 6, 421-425.
- 35 Ghosh, A. and Heston, W.D. Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer. *J. Cell. Biochem.* 2004;91:528-539.
- Haffner, M. C., et al. *Hum Pathol* 2009, 40, 1754-1761
- Haffner, M. C., et al. *Mod Pathol* 2012, 25, 1079-1085.
- Hanaoka, K., et al. *Magn Reson Imaging* 2008, 26, 608-617.
- 40 Helisch, A., et al. Pre-therapeutic dosimetry and biodistribution of 86Y-DOTAPhe1-Tyr3-octreotide versus 111In-pentetreotide in patients with advanced neuroendocrine tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2004;31:1386-1392.
- Hillier, S. M., et al. *J Nucl Med* 2011, 52, 1087-1093.
- Hobbs, R.F., et al. 124I PET-based 3D-RD dosimetry for a pediatric thyroid cancer patient: real-time treatment planning and methodologic comparison. *J. Nucl. Med.* 2009;50:1844-1847.
- 45 Huang, C. H. and Tsourkas, A. *Curr Top Med Chem* 2013, 13, 411-421.
- Kaiser, E., et al. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem* 1970;34:595-598.
- Kam, B.L., et al. Lutetium-labelled peptides for therapy of neuroendocrine tumours. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2012;39 Suppl 1:S103-112.
- 50 Konda, et al. *Magma* 2001, 12, 104-113.
- Kulkarni, H.M.W., et al. First clinical results with Lu-177 PSMA-TUM1 for the treatment of castrate-resistant metastatic prostate cancer. *J. NUCL. Med. Meeting Abstract Vol 55; 2014.*
- Lanza, M., et al. *JNucl Cardiol* 2004, 11, 733-743.
- 55 Low, P.S., Chelvam, V., Kim, Y. PSMA binding linker conjugates and methods for using WO2011/106639, WO 2010/045598 A2, WO 2009/026177A1.
- Ma, D., et al. Radioimmunotherapy for model B cell malignancies using 90Y-labeled anti-CD19 and anti-CD20 monoclonal antibodies. *Leukemia*. 2002;16:60-66.
- Major, J. L. and Meade, T. J. *Acc Chem Res* 2009, 42, 893-903.
- Mastarone, D.J., et al. A modular system for the synthesis of multiplexed magnetic resonance probes. *J Am Chem Soc.* Apr 13 2011;133(14):5329-5337.
- 60 McDevitt, M.R. Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides, *Eur J Nucl Med*, 25 (1998) 1341-1351.
- Mease, R.C., et al. PET imaging in prostate cancer: focus on prostate-specific membrane antigen. *Curr. Top. Med. Chem.* 2013;13:951-962.
- Milowsky, M.I., et al. Vascular targeted therapy with anti-prostatespecific membrane antigen monoclonal antibody J591 in advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* 2007;25:540-547.
- 65 Nayak, T.K. and Brechbiel, M.W. 86Y based PET radiopharmaceuticals: radiochemistry and biological applications.

- Med. Chem. 2011;7:380-388.
- Olson, W.C., et al. Clinical trials of cancer therapies targeting prostate specific membrane antigen. *Rev. Recent Clin. Trials.* 2007;2:182-190.
- 5 Olszewski, R.T., et al. NAAG peptidase inhibition reduces locomotor activity and some stereotypes in the PCP model of schizophrenia via group II mGluR. *J. Neurochem.* 2004;89:876-885.
- Palm, S., et al. Pharmacokinetics and biodistribution of (86)Ytrastuzumab for (90)Y dosimetry in an ovarian carcinoma model: correlative MicroPET and MRI. *J. Nucl. Med.* 2003;44:1148-1155.
- Pomper, M.G., Ray, S., Mease, R.C., Foss, C. Labeled inhibitors of prostate specific membrane antigen (PSMA), biological evaluation, and use as imaging agents. WO 2009/002529 A2.
- 10 Rooney, W. D., et al. *Magn Reson Med* 2007, 57, 308-318.
- Schulke, N., et al. The homodimer of prostate-specific membrane antigen is a functional target for cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2003;100:12590-12595.
- Schwartz, J., et al. Renal uptake of bismuth-213 and its contribution to kidney radiation dose following administration of actinium-225-labeled antibody. *Phys. Med. Biol.* 2011;56:721-733.
- 15 Silver, D.A., et al. Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clin. Cancer Res.* 1997;3:81-85.
- Song, Y., et al. *JAm Chem Soc* 2008, 130, 6662-6663.
- Stabin, M.G., et al. OLINDA/EXM: the second-generation personal computer software for internal dose assessment in nuclear medicine. *J. Nucl. Med.* 2005;46:1023-1027.
- 20 Tagawa, S.T., et al. Bone marrow recovery and subsequent chemotherapy following radiolabeled anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody j591 in men with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Front. Oncol.* 2013;3:1-6.
- Tagawa, S.T., et al. Phase II study of Lutetium-177-labeled anti-prostate specific membrane antigen monoclonal antibody J591 for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 2013;19:5182-5191.
- 25 Tse, B. W., et al. *Nanomedicine* 2015, 10, 375-386.
- Vallabhajosula, S., et al. Pharmacokinetics and biodistribution of 111In- and 177Lu-labeled J591 antibody specific for prostate-specific membrane antigen: prediction of 90YJ591 radiation dosimetry based on 111In or 177Lu? *J. Nucl. Med.* 2005;46:634-641.
- Witzig, T.E., et al. Safety of yttrium-90 ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy for relapsed low-grade, follicular, or transformed non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21:1263-1270.
- 30 Woodard, H.Q., et al. Letter: Expression of tissue isotope distribution. *J. Nucl. Med.* 1975; 16:958-959.
- Wu, X. et al. *Bioconjug Chem* 2012; 23, 1548-1556.
- Yong, K. and Brechbiel, M.W. Towards translation of 212Pb as a clinical therapeutic; getting the lead in!, *Dalton Trans*, 40 (2011) 6068-6076.
- 35 Yong, K.J. et al. (212)Pb-radioimmunotherapy induces G(2) cell-cycle arrest and delays DNA damage repair in tumor xenografts in a model for disseminated intraperitoneal disease, *Mol. Cancer Ther.*, 11 (2012) 639-648. Yong, K.J. et al. 212Pb-radioimmunotherapy potentiates paclitaxel-induced cell killing efficacy by perturbing the mitotic spindle checkpoint, *Br. J. Cancer*, 108 (2013) 2013-2020.
- 40 Yoo, J., et al. Preparation of high specific activity (86)Y using a small biomedical cyclotron. *Nucl. Med. Biol.* 2005; 32:891-897.
- Zechmann, C.M., et al. Radiation dosimetry and first therapy results with a (124)I/ (131)I-labeled small molecule (MIP-1095) targeting PSMA for prostate cancer therapy. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2014; 41:1280-292.



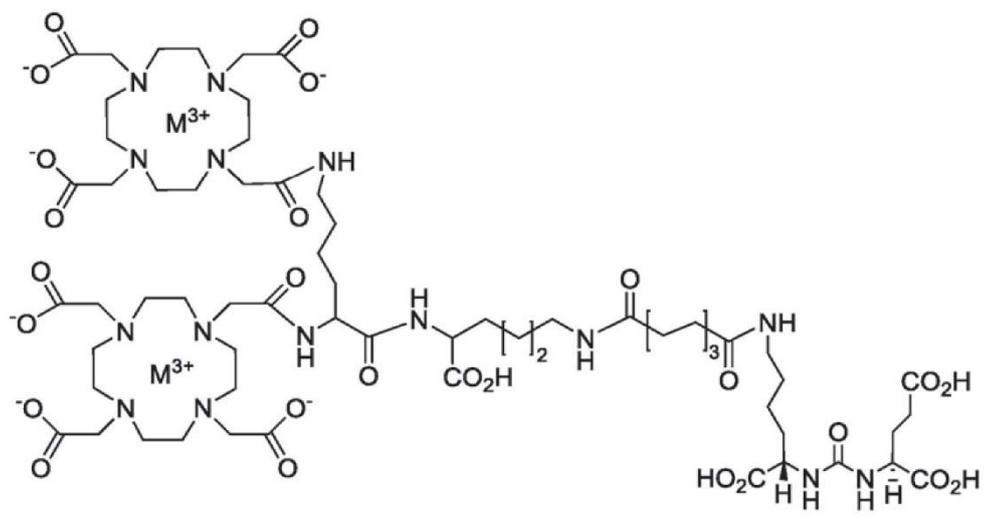
y



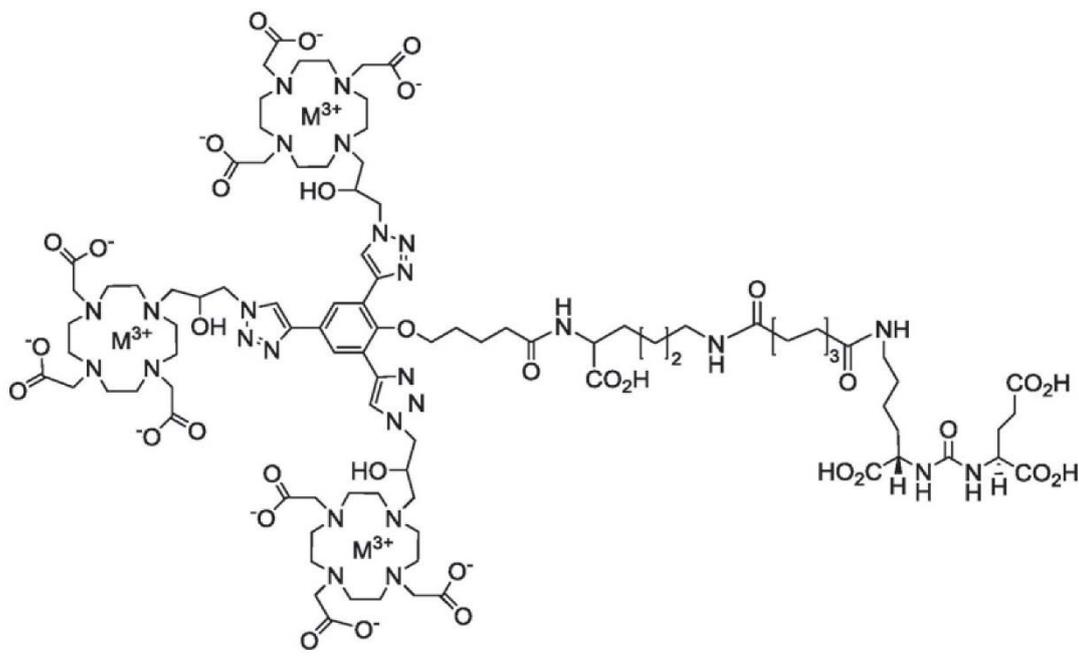
5

en la que q es un número entero seleccionado del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



y



5

en las que:

- 10 M es un metal o un radiometal; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
3. Un compuesto de la reivindicación 1, en el que dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en Gd: Gd-157 (isótopo estable), Lu, Ac, Bi, Pb, Cu, In, Sc, e Y.
- 15 4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el radiometal se selecciona del grupo que consiste en Lu-177, Ac-225, Bi-213, Bi-212, Pb-212, Cu-67, In-III, Sc-47, Y-90, Y-86 y Sc-44.
- 20 5. Un método para obtener imágenes de uno o más tumores o células de antígeno prostático específico de membrana (PSMA), comprendiendo el método poner en contacto el uno o más tumores o células con una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) como se define en una cualquiera de reivindicaciones 1 a 3 y hacer una imagen, en la que uno o más tumores o células que expresan PSMA están *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*, y cuando están *in vivo* están presentes en un sujeto.
- 25 6. El método de la reivindicación 5, en el que el metal se selecciona del grupo que consiste en Gd, Lu, Ac, Bi, Pb, Cu, In, Sc e Y.

7. El método de la reivindicación 5, en el que la obtención de imágenes comprende imágenes de resonancia magnética (IRM) y el metal no radiactivo es Gd-157 (isótopo estable).
- 5 8. El método de la reivindicación 5, en el que la obtención de imágenes comprende
- (i) imágenes por tomografía de emisión de positrones (PET) y el radiometal se selecciona del grupo que consiste en Y- 86 y Sc-44, o
 - (ii) imágenes por tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), y el radiometal se selecciona del
- 10 grupo que consiste en Lu-177 e In-111.
9. El método de la reivindicación 5, en el que el uno o más tumores o células que expresan PSMA se seleccionan del grupo que consiste en: un tumor o célula de próstata, un tumor o célula de próstata metastatizada, un tumor o célula de pulmón, un tumor o célula de riñón, un glioblastoma, un tumor o célula de páncreas, un tumor o célula de vejiga, un sarcoma, un melanoma, un tumor o célula de mama, un tumor o célula de colon, una célula germinal, un feocromocitoma, un tumor o célula esofágica, un tumor o célula de estómago, y combinaciones de los mismos.
- 15
10. El método de la reivindicación 5, en el que el compuesto de fórmula (I) se elimina del tumor o célula en el sujeto.
- 20 11. El método de la reivindicación 5, en el que el compuesto de fórmula (I) es como se define en la reivindicación 3, y se elimina más rápidamente de los riñones de un sujeto que de un tumor del sujeto.
12. Un compuesto de fórmula (I) como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en un método para tratar uno o más tumores o células de antígeno prostático específico de membrana (PSMA) en un sujeto, comprendiendo el método poner en contacto el uno o más tumores o células con una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) y formar una imagen.
- 25
13. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el método comprende tratar uno o más tumores o células de antígeno prostático específico de membrana (PSMA) y el radiometal se selecciona del grupo que consiste en Lu-177, Ac-225, Bi-212, Bi-213, Pb-212, Cu-67, In-III, Sc-47, e Y-90.
- 30
14. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el uno o más tumores o células que expresan PSMA se seleccionan del grupo que consiste en: un tumor o célula de próstata, un tumor o célula de próstata metastatizada, un tumor o célula de pulmón, un tumor o célula de riñón, un glioblastoma, un tumor o célula de páncreas, un tumor o célula de vejiga, un sarcoma, un melanoma, un tumor o célula de mama, un tumor o célula de colon, una célula germinal, un feocromocitoma, un tumor o célula esofágica, un tumor o célula de estómago, y combinaciones de los mismos.
- 35

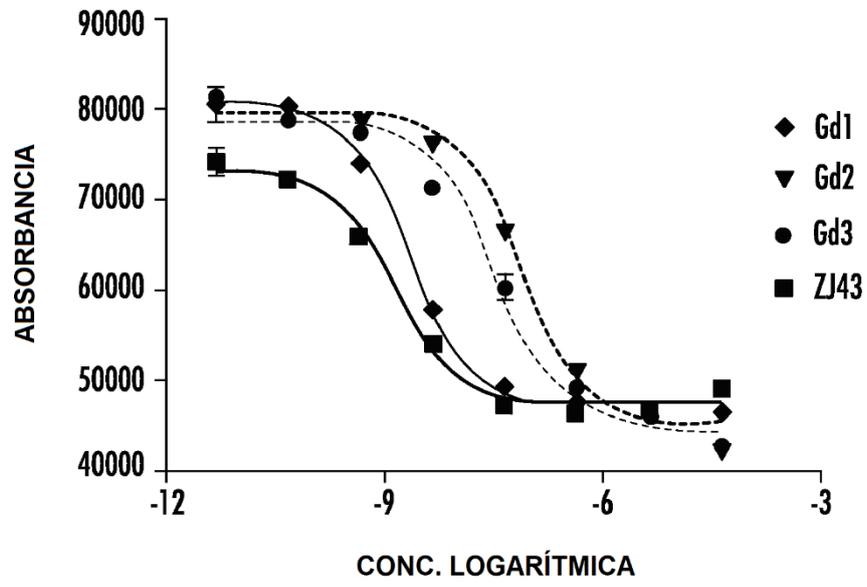


FIG. 1B

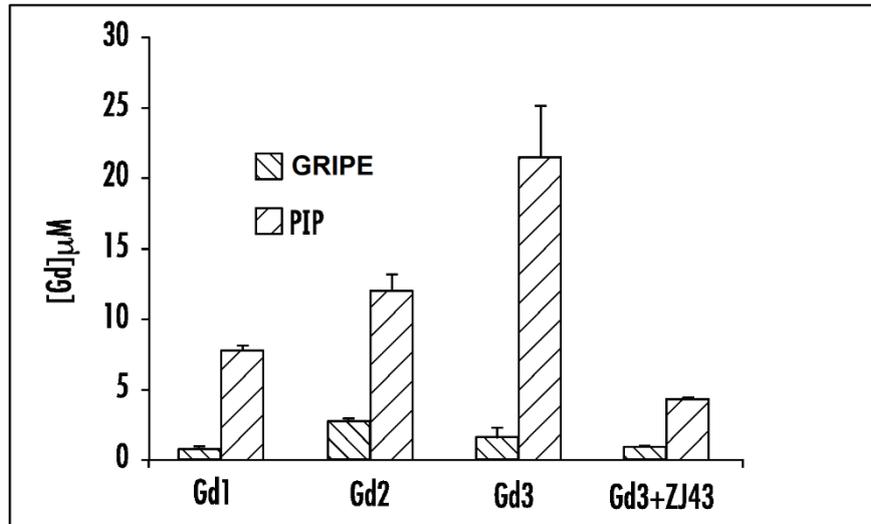


FIG. 2

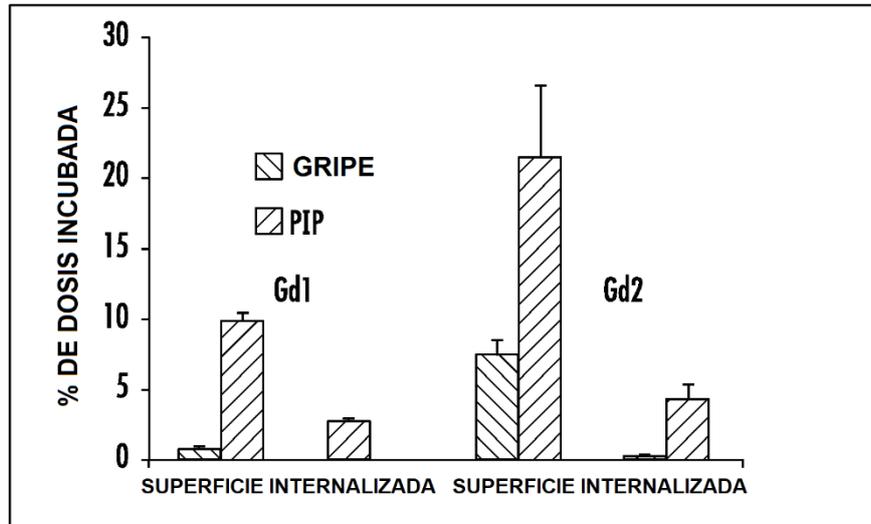


FIG. 3

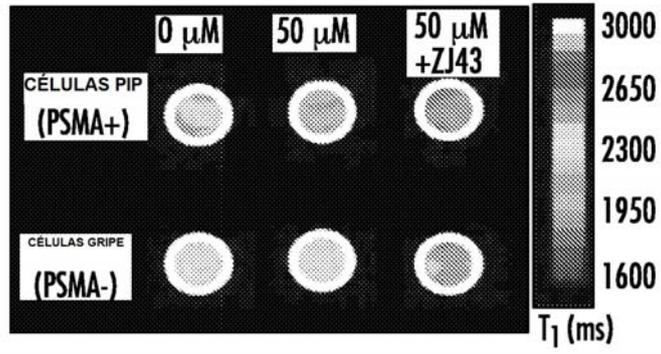


FIG. 4A

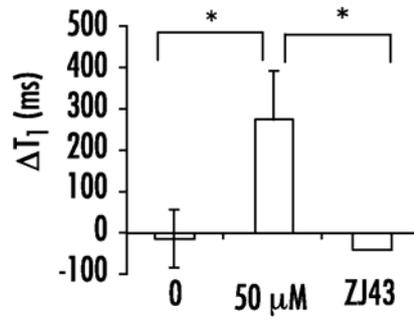


FIG. 4B

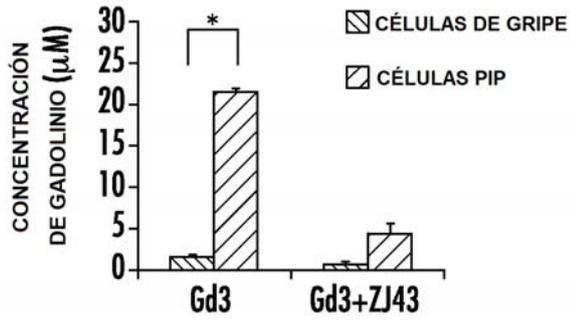


FIG. 4C

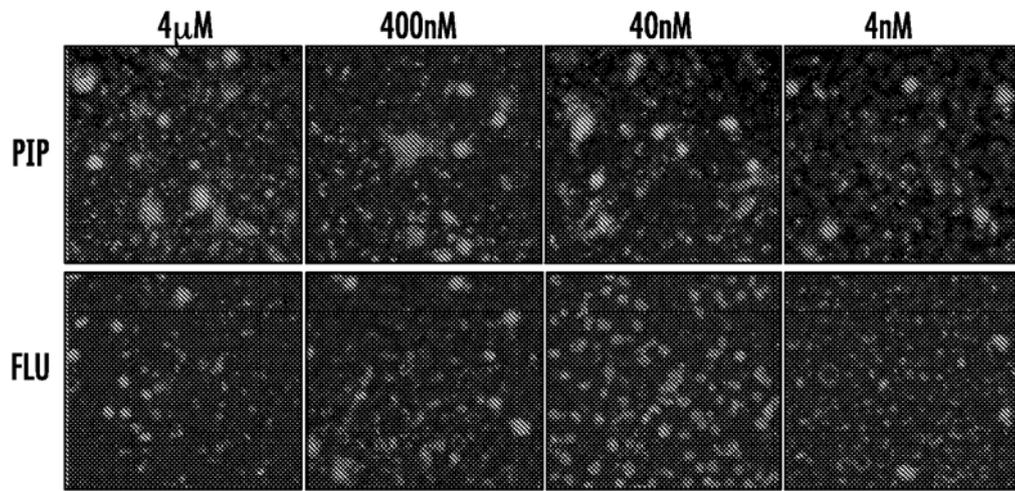


FIG. 5A

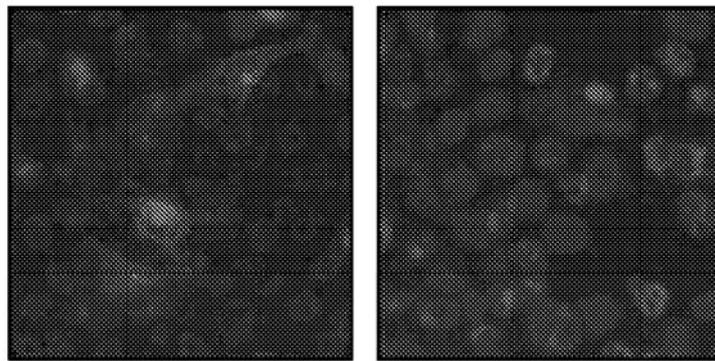
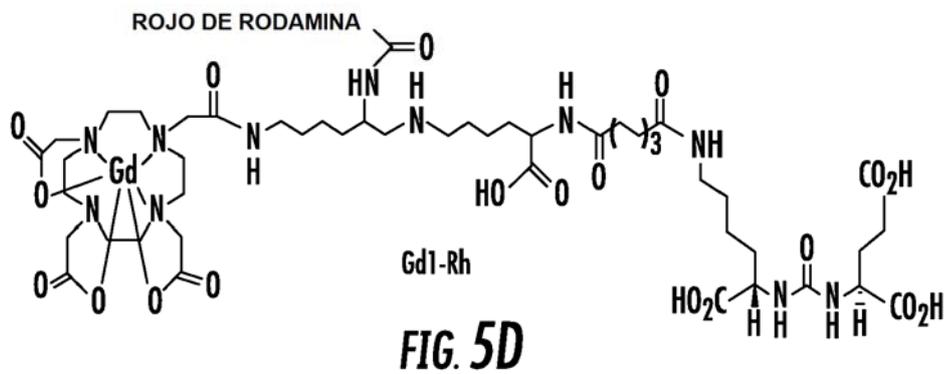


FIG. 5B

FIG. 5C



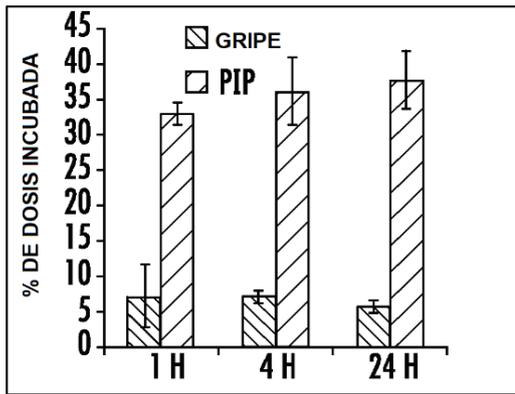


FIG. 6A

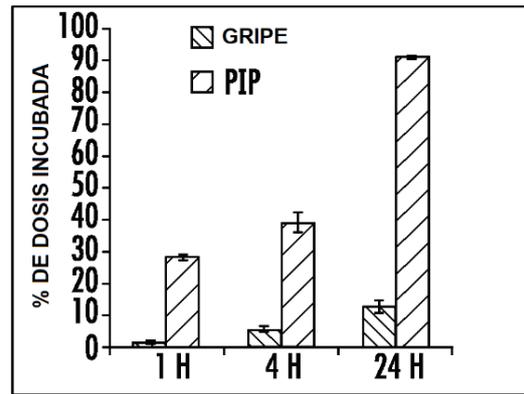


FIG. 6B

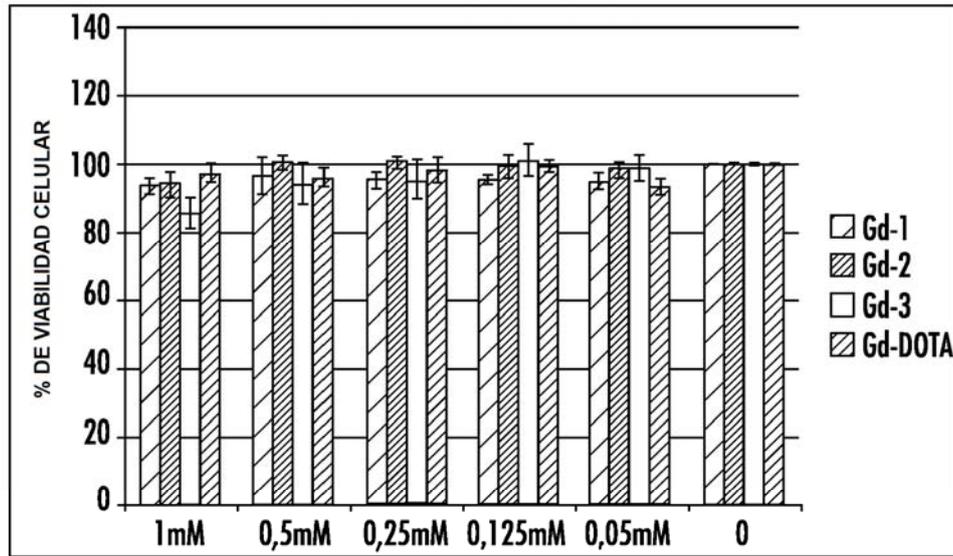


FIG. 7

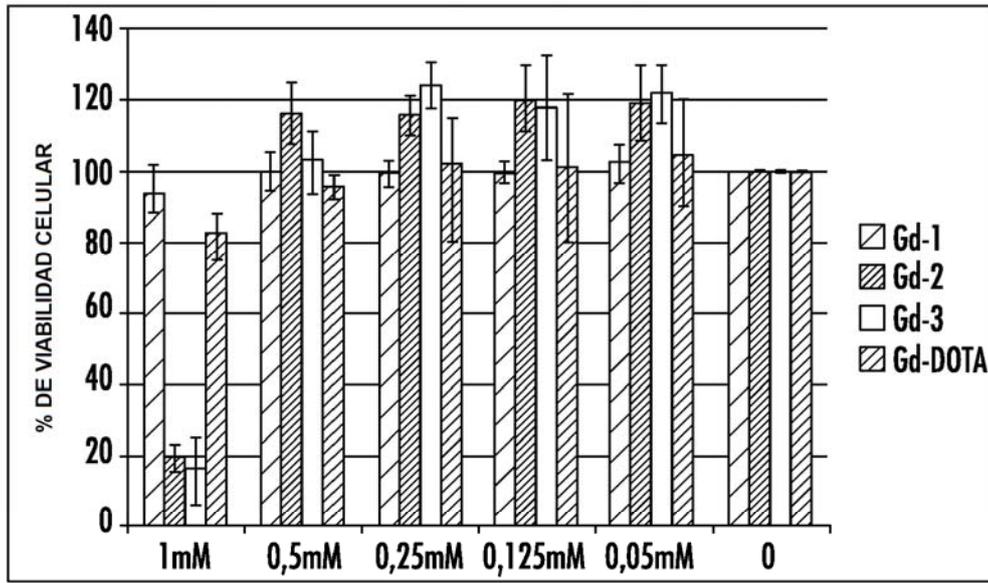
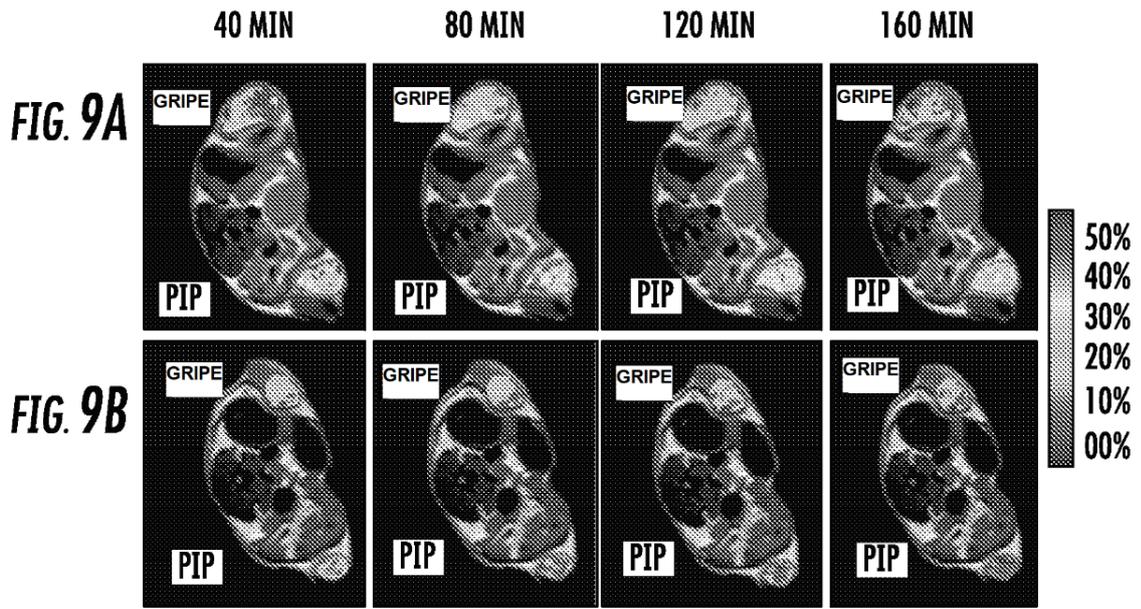


FIG. 8



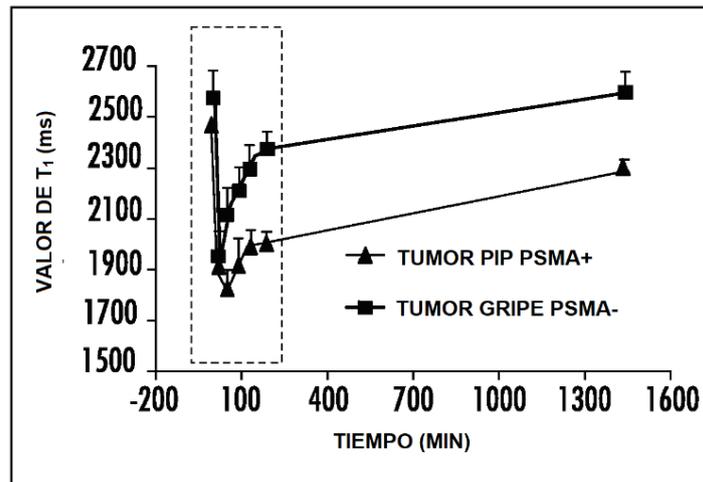


FIG. 10A

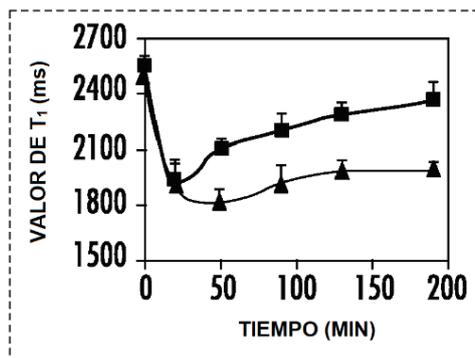


FIG. 10B

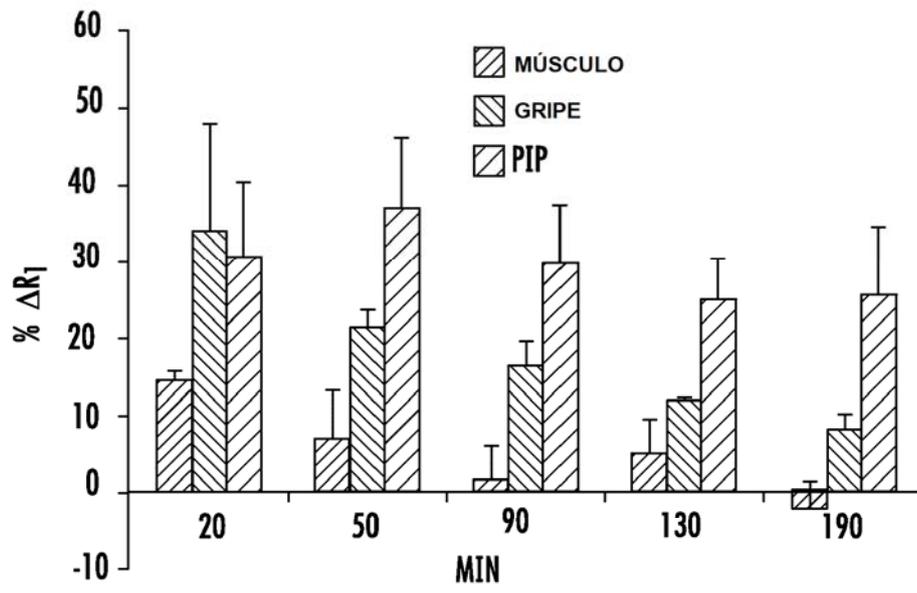


FIG. 11

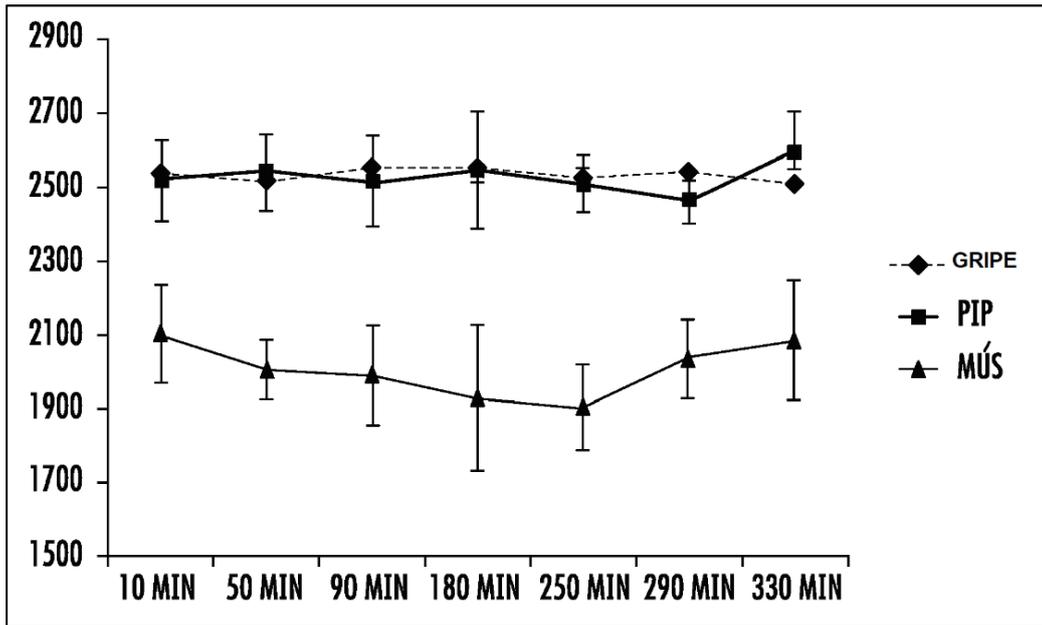


FIG. 12

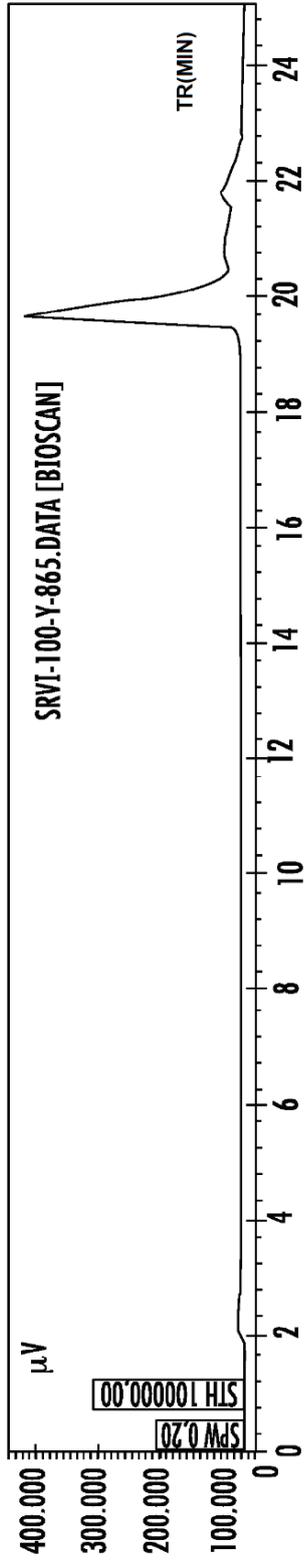


FIG. 15A

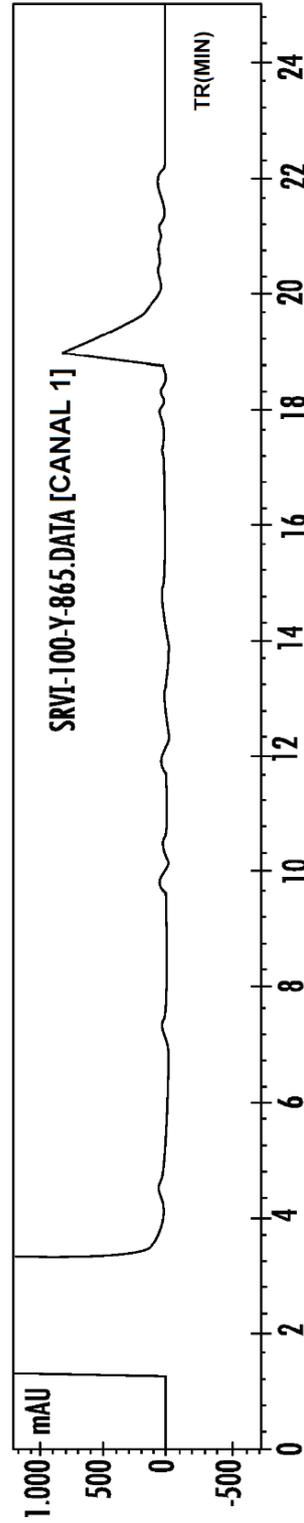


FIG. 15B

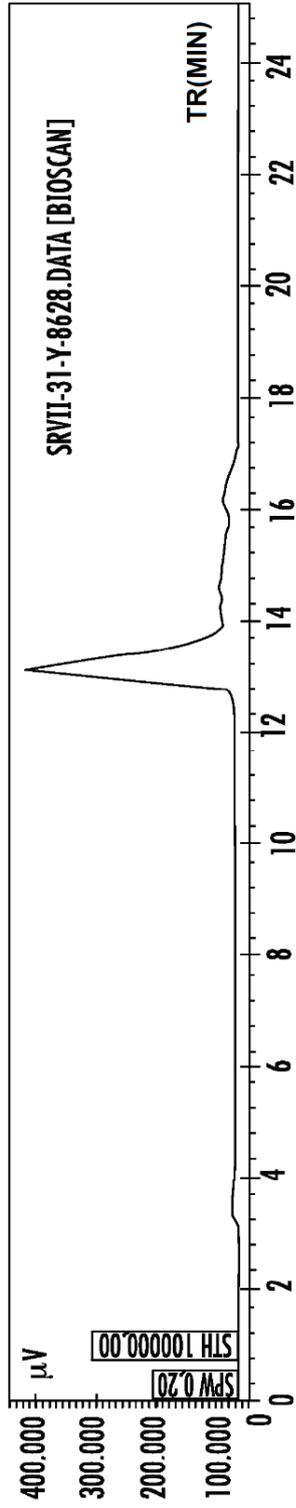


FIG. 16A

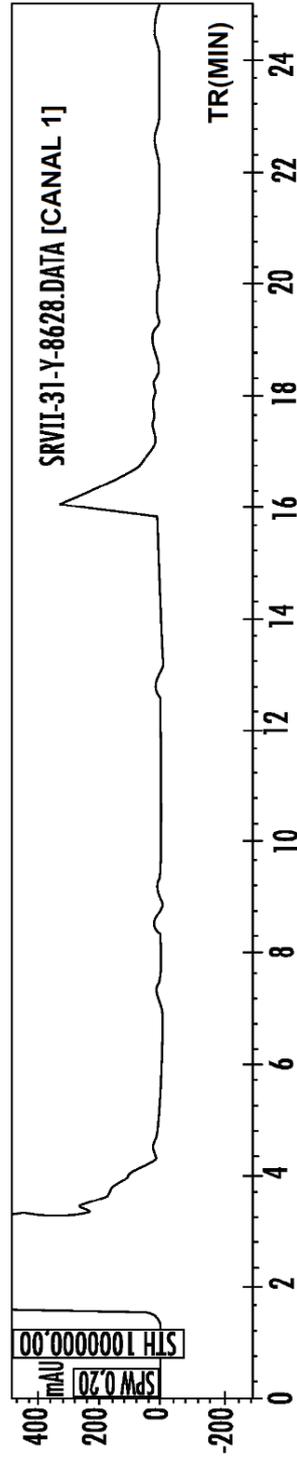


FIG. 16B

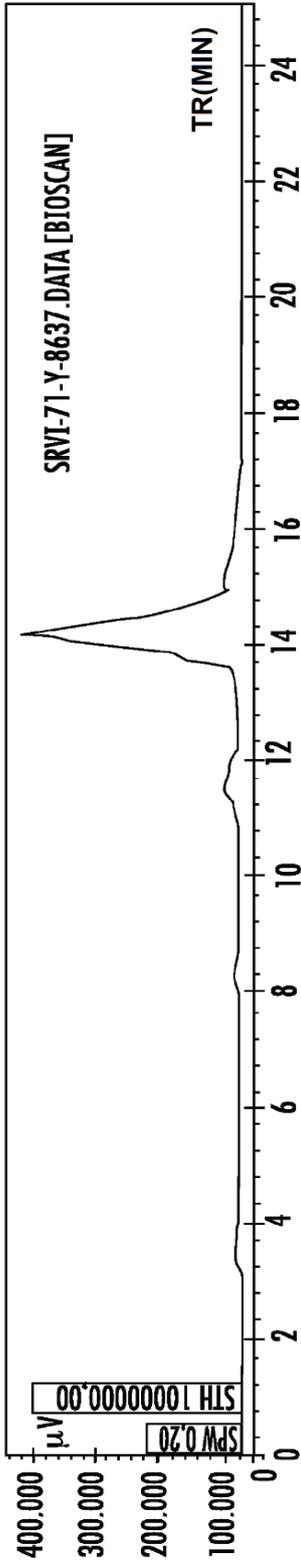


FIG. 17A

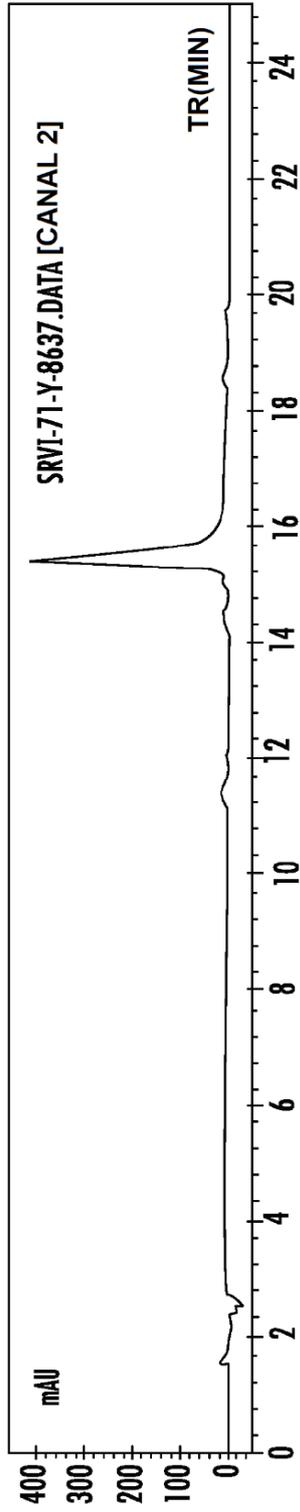


FIG. 17B

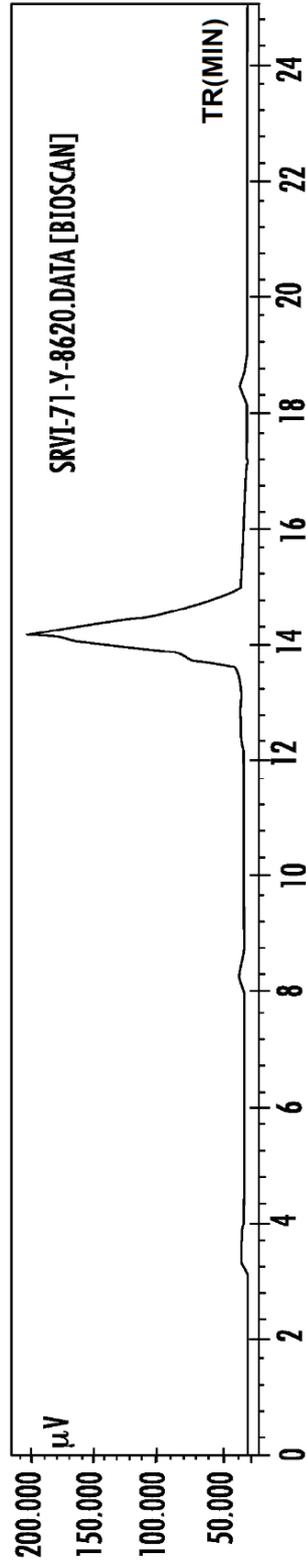
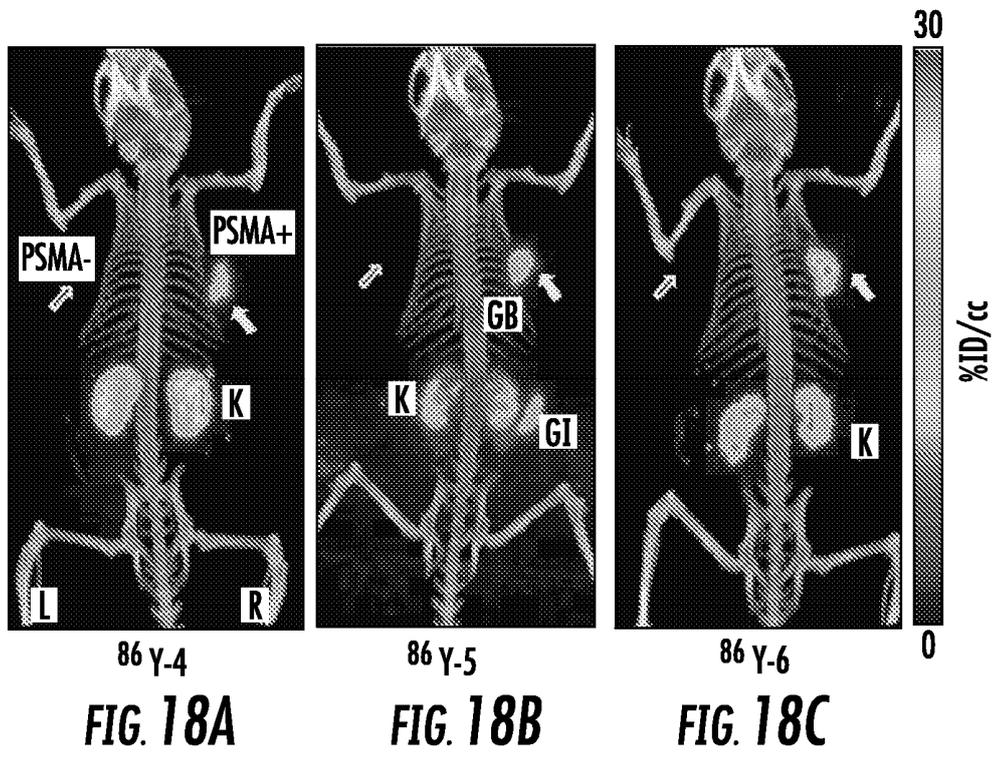


FIG. 17C



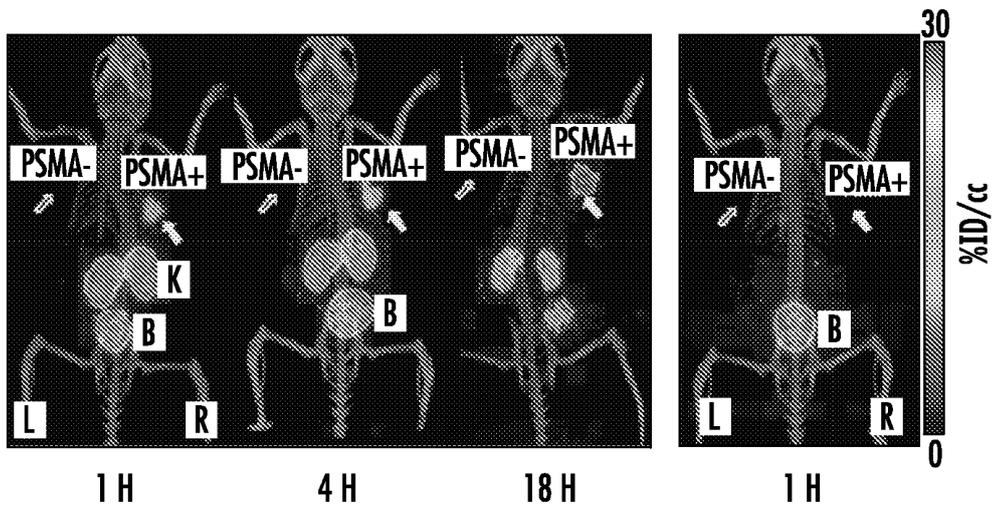


FIG. 19A

FIG. 19B

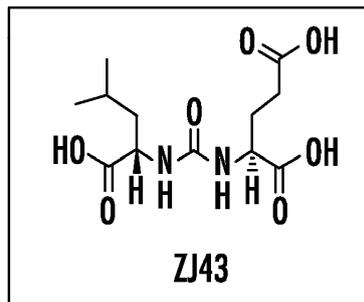
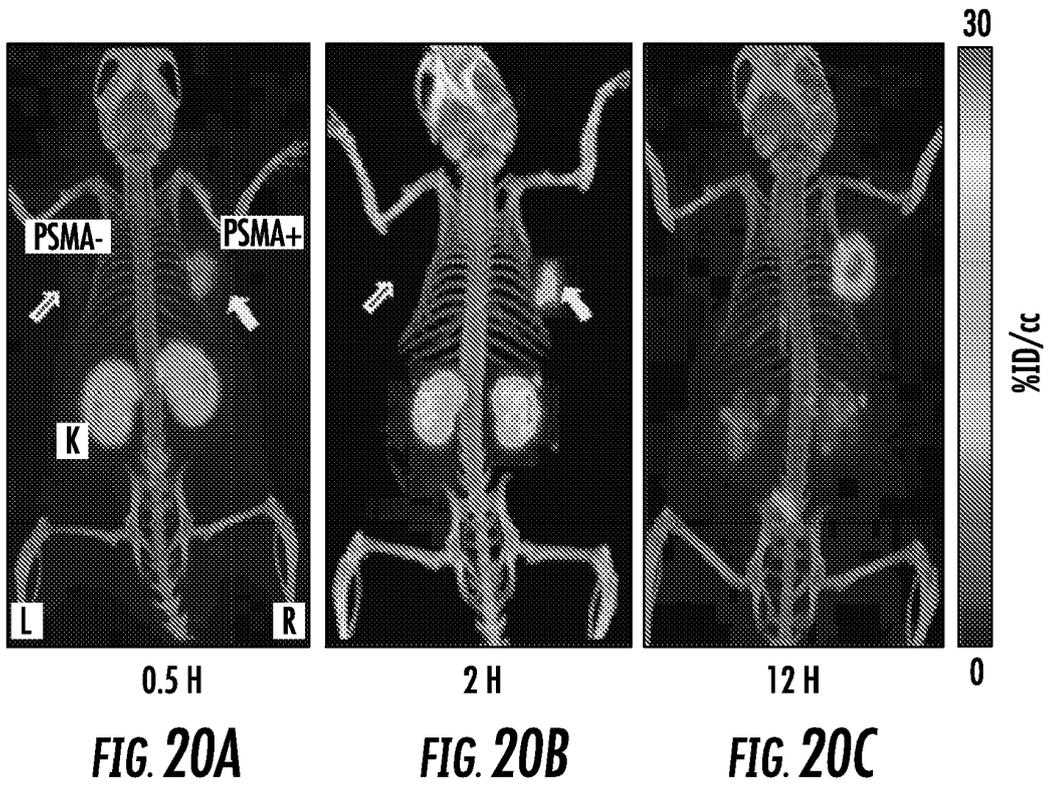


FIG. 19C



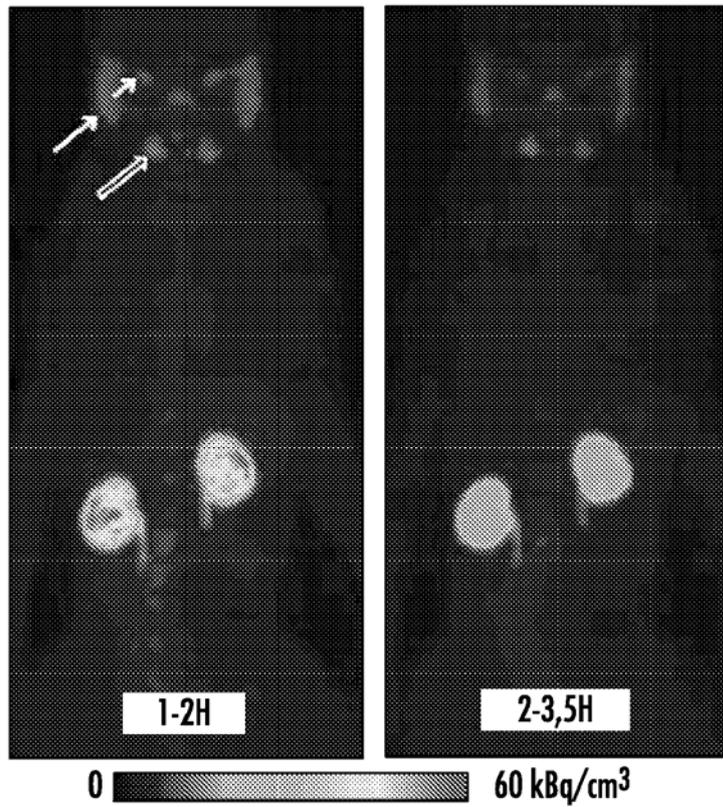


FIG. 21A

FIG. 21B

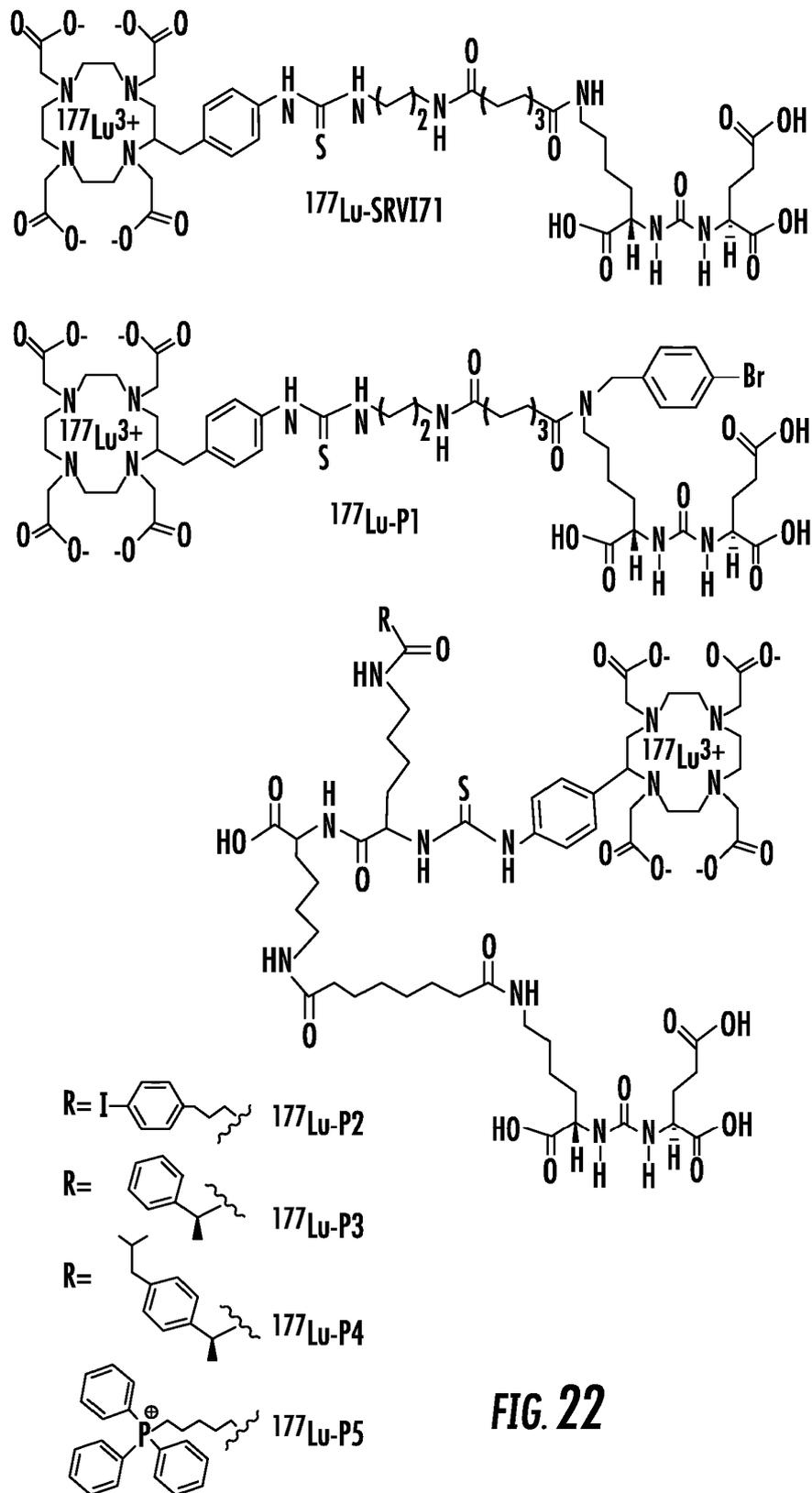


FIG. 22

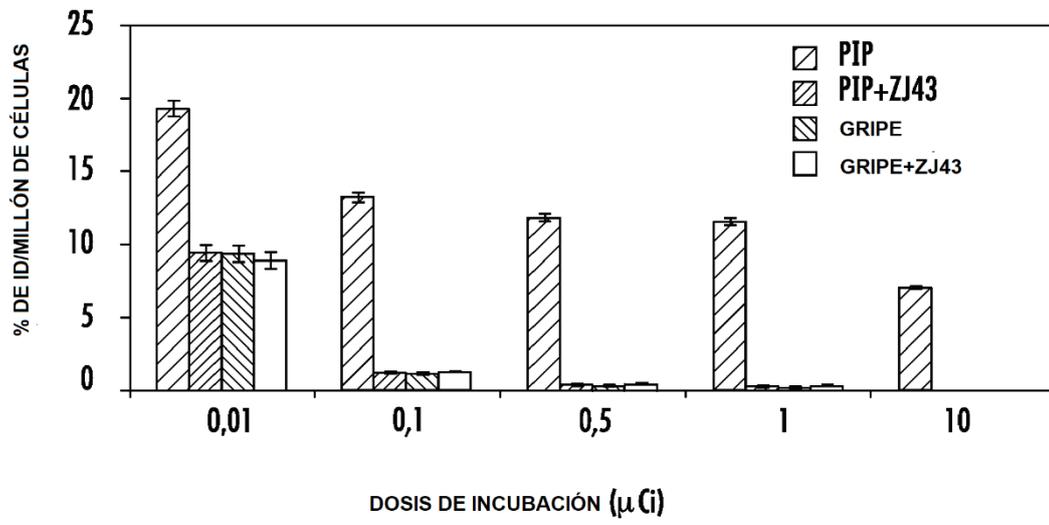


FIG. 23

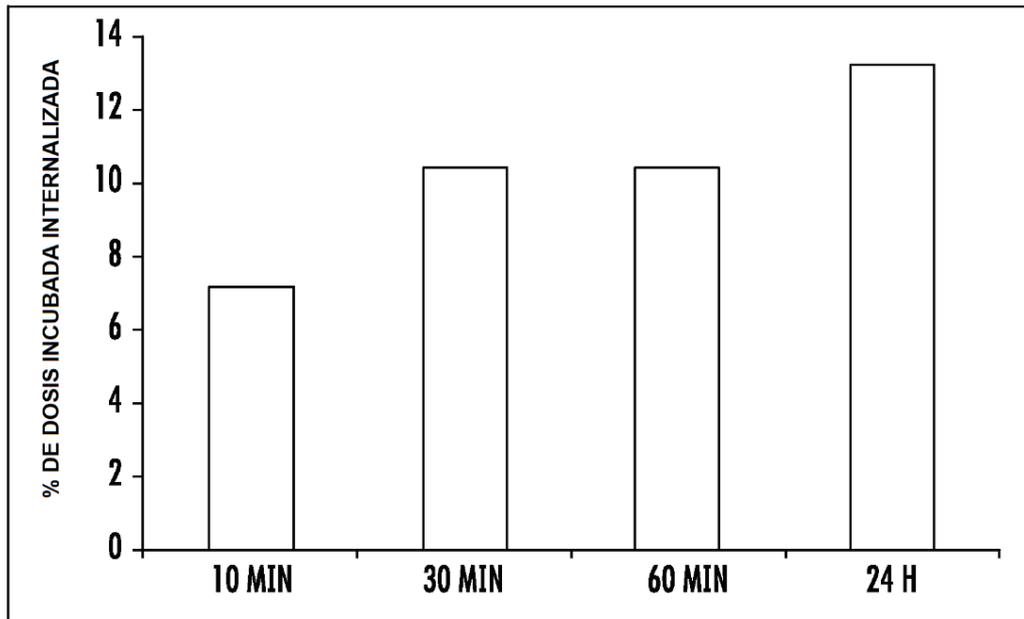


FIG. 24

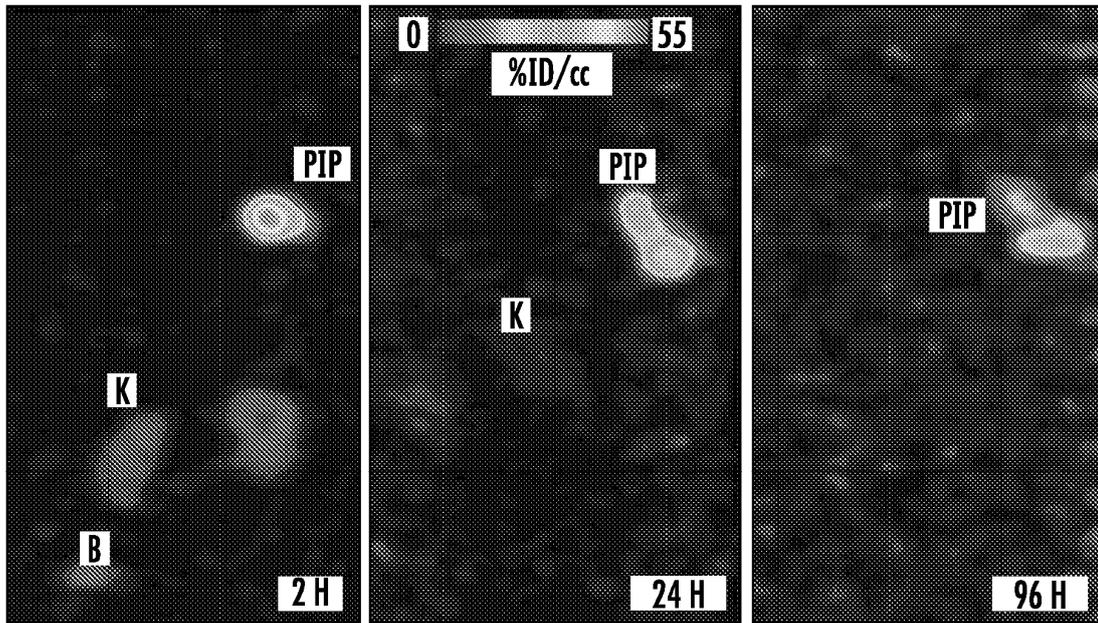


FIG. 25A

FIG. 25B

FIG. 25C

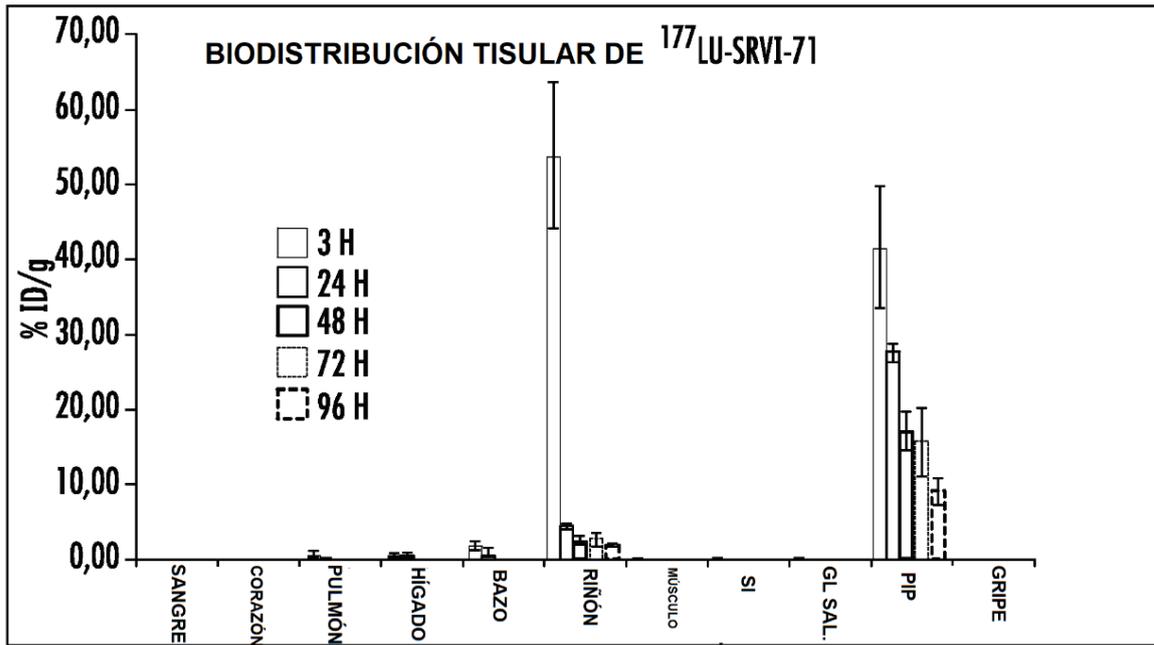


FIG. 26

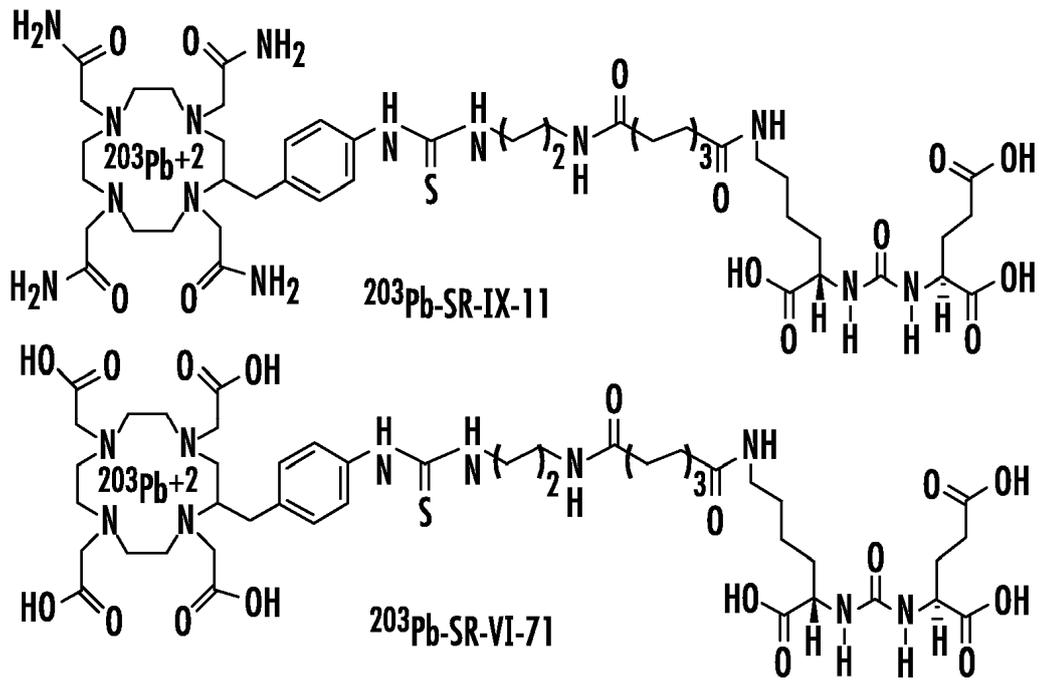
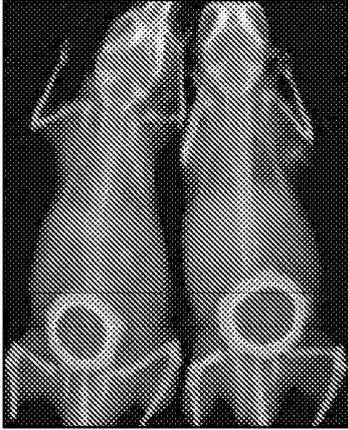
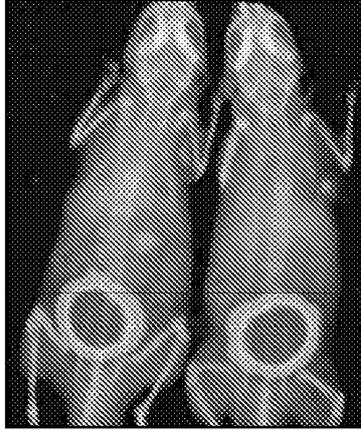


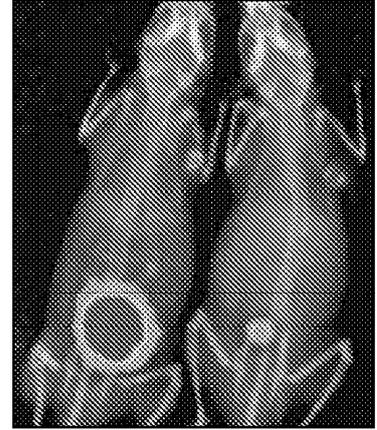
FIG. 27



60 MIN
FIG. 28A



120 MIN
FIG. 28B



240 MIN
FIG. 28C

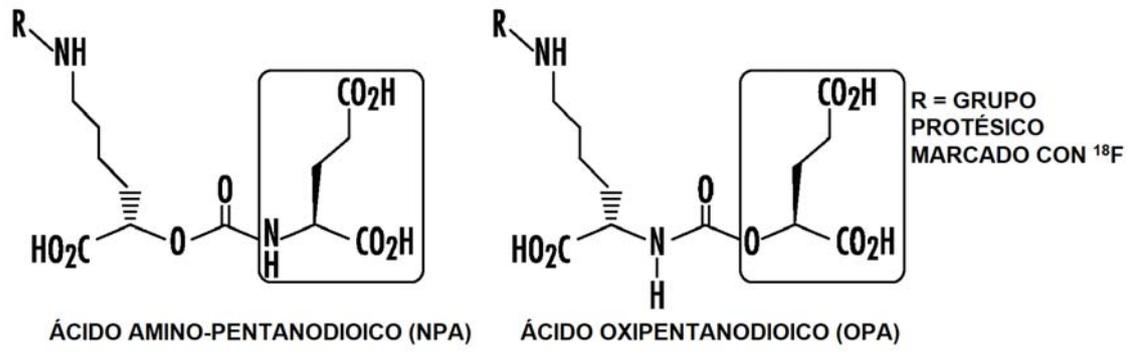


FIG. 29

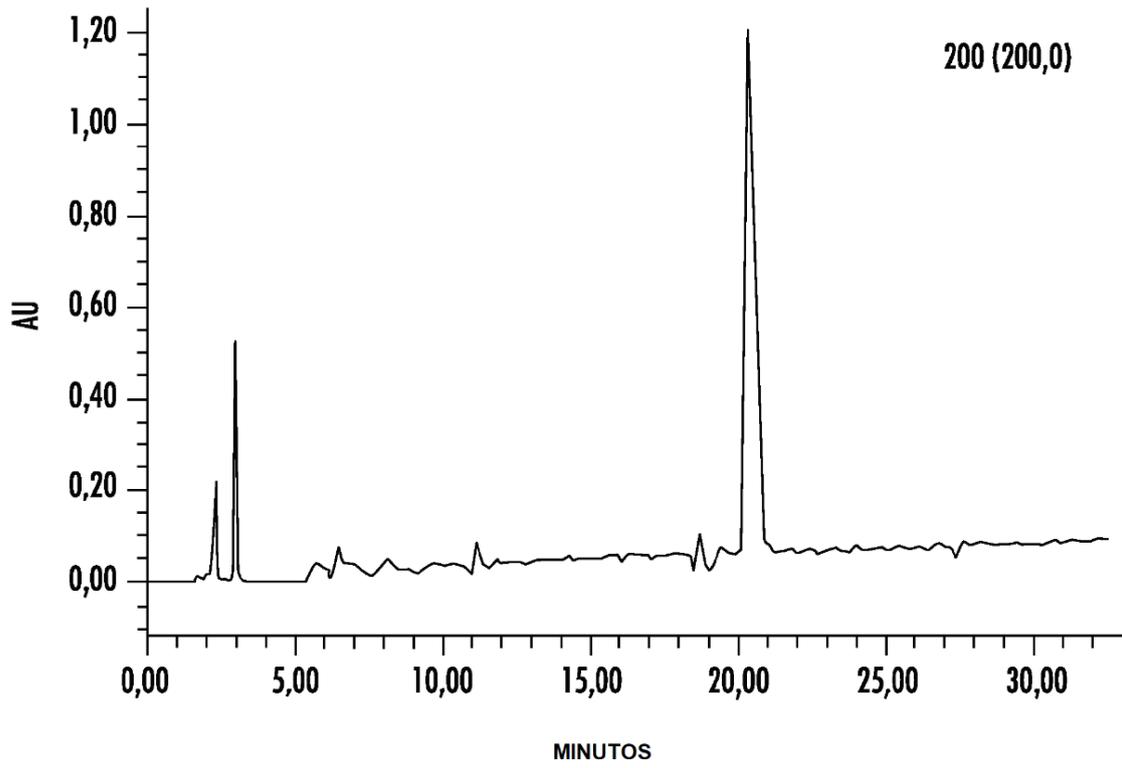


FIG. 30

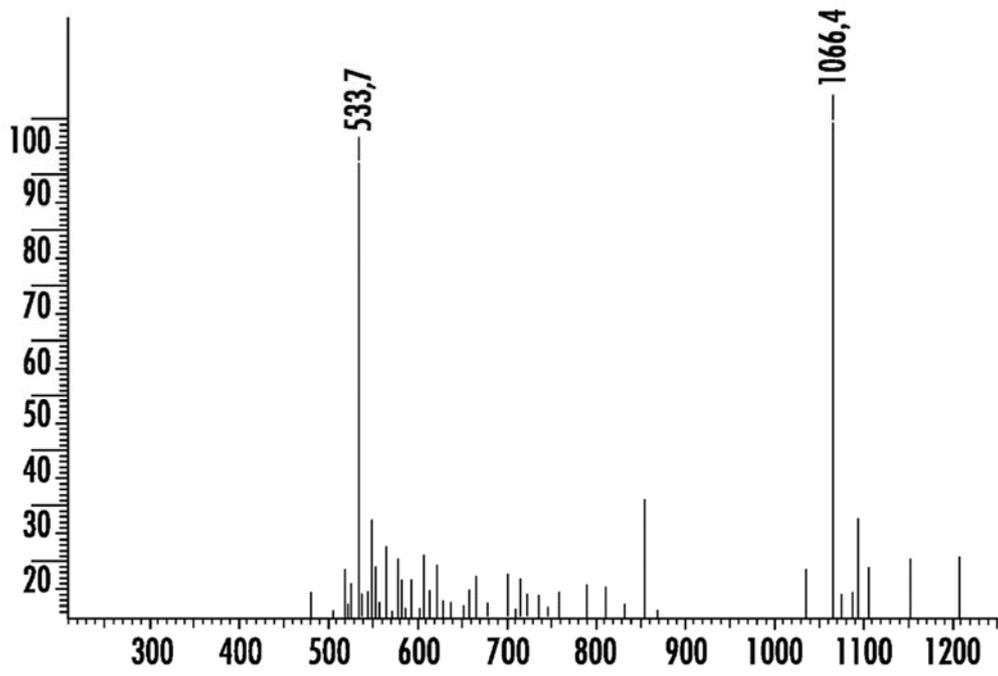


FIG. 31

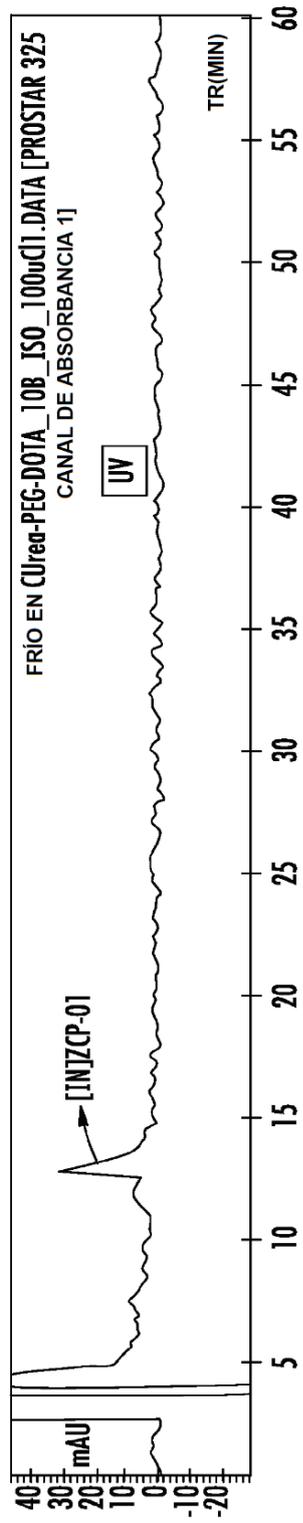


FIG. 32

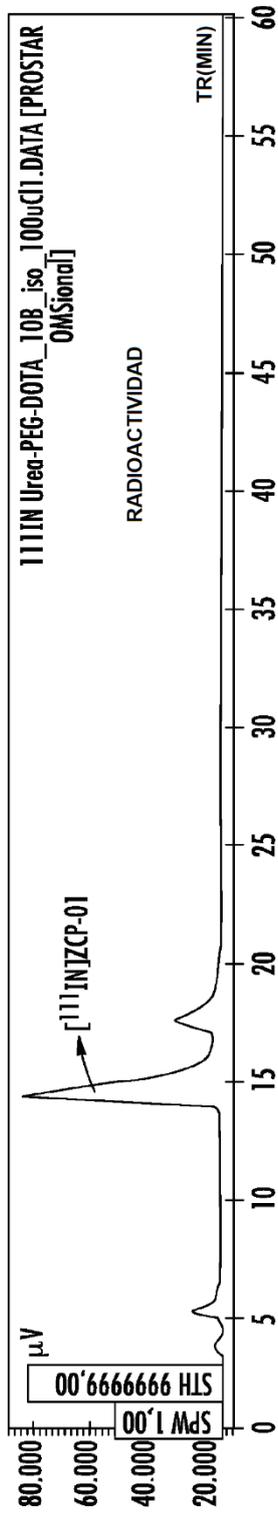


FIG. 33A

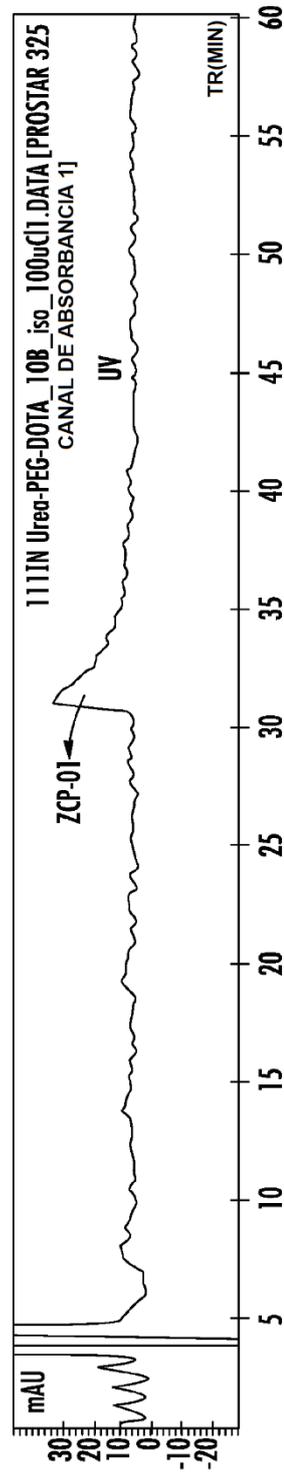


FIG. 33B

