

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
19 de septiembre de 2019 (19.09.2019) **WIPO | PCT**

(10) Número de publicación internacional
WO 2019/177449 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
C07F 13/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 51/04 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/MX2019/000025

(22) Fecha de presentación internacional:
07 de marzo de 2019 (07.03.2019)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
MX/a/2018/003175
14 de marzo de 2018 (14.03.2018) MX

(71) Solicitante: **INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES** [MX/MX]; Carretera México-Toluca S/N, La Marquesa, Ocoyoacac, Estado de México, 52750 (MX).

(72) Inventores: **FERRO FLORES, Guillermina**; Carretera México-Toluca S/N, La Marquesa, Ocoyoacac, Estado de México, 52750 (MX). **OCAMPO GARCÍA, Blanca Eli**; Carretera México-Toluca S/N, La Marquesa, Ocoyoacac, Estado de México, 52750 (MX). **LUNA GUTIÉRREZ, Myrna Alejandra**; Carretera México-Toluca S/N, La Marquesa, Ocoyoacac, Estado de México, 52750 (MX). **SANTOS CUEVAS, Clara Leticia**; Carretera México-Toluca S/N, La Marquesa, Ocoyoacac, Estado de México, 52750 (MX). **AZORÍN VEGA, Erika Patricia**; Carretera México-Toluca S/N, La Marquesa, Ocoyoacac, Estado de México, 52750 (MX). **JIMÉNEZ MANCILLA, Nallely Patri-**

(54) Title: 177LU-DOTA-HYNIC-IP SMA AS A THERAPEUTIC RADIOPHARMACEUTICAL TARGETING PROSTATE-SPECIFIC MEMBRANE ANTIGEN

(54) Título: 177LU-DOTA-HYNIC-IP SMA COMO UN RADIOFÁRMACO TERAPÉUTICO DIRIGIDO AL ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO DE MEMBRANA

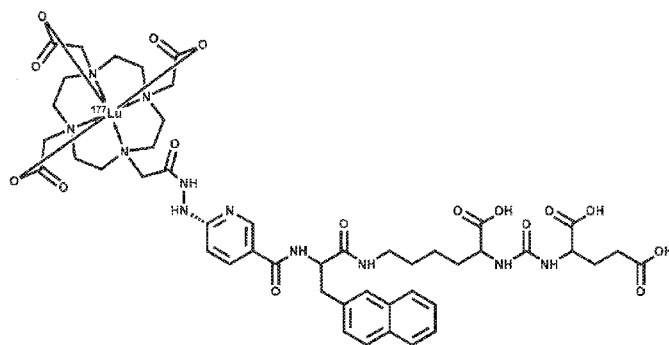


Figura 1

(57) Abstract: The invention relates to a new lutetium-177 therapeutic radiopharmaceutical as an inhibitor of prostate-specific membrane antigen (iPSMA), wherein 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA) bonded to the heterocyclic molecule hydrazinonicotinamide (HYNIC), generates a rigid chemical structure that minimises the number of conformers and intramolecular hydrogen bonds, thereby producing a favourable spatial orientation of the active site (Lys(Nal)-NH-CO-NH-Glu) in the molecule, for biological recognition by the PSMA protein. The new 177Lu-DOTA-HYNIC-iPSMA radiopharmaceutical accumulates, with high affinity in vivo, in tumours that overexpress the PSMA protein, acting as a radiotherapeutic agent. The purpose of the invention is to provide a new specific radiopharmaceutical (molecular target radiopharmaceutical) for the treatment of tumours with PSMA over-

[Continúa en la página siguiente]

cia; Carretera México-Toluca S/N, La Marquesa, Ocoyoacac, Estado de México, 52750 (MX). **HERNÁNDEZ JIMÉNEZ, Tania**; Carretera México-Toluca S/N, La Marquesa, Ocoyoacac, Estado de México, 52750 (MX). **RAMÍREZ DE LA CRUZ, Flor de María**; Carretera México-Toluca S/N, La Marquesa, Ocoyoacac, Estado de México, 52750 (MX).

(74) **Mandatario: FERRO FLORES, Guillermina** et al.; Carretera México-Toluca S/N, La Marquesa, Ocoyoacac, Estado de México, 52750 (MX).

(81) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

- sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))
- sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

expression.

(57) **Resumen:** Esta invención se refiere a un nuevo radiofármaco terapéutico de lutecio-177 como inhibidor del antígeno prostático específico de membrana (iPSMA), donde el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) unido a la molécula hidrazinonicotinamida (HYNIC) de naturaleza heterocíclica, genera una estructura química rígida que minimiza el número de conformeros y enlaces de hidrógeno intramoleculares, produciendo una orientación espacial favorable del sitio activo (Lys(Nal)-NH-CO-NH-Glu) en la molécula para el reconocimiento biológico por la proteína PSMA. El nuevo radiofármaco de ¹⁷⁷Lu-DOTA-HYNIC-iPSMA se acumula, con alta afinidad in vivo, en tumores que sobre-expresan a la proteína PSMA, actuando como un agente radioterapéutico. El objeto de esta invención es proporcionar un nuevo radiofármaco específico (radiofármaco de blancos moleculares) para el tratamiento de tumores con sobre-expresión de PSMA.

**¹⁷⁷Lu-DOTA-HYNIC-IP SMA COMO UN RADIOFÁRMACO TERAPÉUTICO
DIRIGIDO AL ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO DE MEMBRANA**

DESCRIPCIÓN

5

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un nuevo radiofármaco terapéutico de lutecio-
177 como inhibidor del antígeno prostático específico de membrana (iPSMA),
donde el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA)
10 unido a la molécula hidrazinonicotinamida (HYNIC) de naturaleza heterocíclica,
genera una estructura química rígida que minimiza el número de conformeros y
enlaces de hidrógeno intramoleculares, produciendo una orientación espacial
favorable del sitio activo (Lys(Nal)-NH-CO-NH-Glu) en la molécula para el
reconocimiento biológico por la proteína PSMA. El nuevo radiofármaco de
15 ¹⁷⁷Lu-DOTA-HYNIC-IP SMA se acumula, con alta afinidad *in vivo*, en tumores que
sobre-expresan a la proteína PSMA, actuando como un agente radioterapéutico.

ANTECEDENTES

El cáncer de próstata (CaP) es el segundo cáncer más común en hombres en
20 todo el mundo [Jemal A, et al. *Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin.* 2010, 60:
277–300]. En los pacientes con CaP localizado, la tasa de supervivencia a cinco
años se aproxima al 100%; sin embargo, en los pacientes con metástasis, la tasa
de supervivencia a los cinco años es de 31% [Wei Q, et al. *Global analysis of
differentially expressed genes in androgen-independent prostate cancer. Prostate*
25 *Cancer Prostatic Dis.* 2007, 10: 167–174]. Casi todos los pacientes con metástasis
responden inicialmente bien a los tratamientos anti-andrógenos. Sin embargo, la
principal causa de muerte en pacientes con CaP es la progresión a la
independencia de andrógenos.

La enzima glutamato carboxipeptidasa II, también conocida como antígeno
30 prostático específico de membrana (PSMA), está expresada en las células

epiteliales de la próstata y altamente sobre-expresada en el 95 % de los cánceres de próstata avanzados. Los niveles de expresión del PSMA se correlacionan directamente a la independencia de andrógenos, la metástasis y a la progresión de CaP [Santoni M., et al. *Targeting prostate-specific membrane antigen for personalized therapies in prostate cancer: morphologic and molecular backgrounds and future promises. J Biol Regul Homeost Agents. 2014, 28: 555–563*]. Por lo tanto, el PSMA es un blanco molecular adecuado para la detección por imagen y la radioterapia de cáncer de próstata metastásico utilizando radiofármacos específicos.

- El gen de PSMA se compone de 19 exones que abarcan ~ 60 kb del ADN genómico. Este gen codifica una proteína de tipo II transmembranal con fragmento citoplasmático corto (19 aminoácido), un dominio transmembranal hidrófobo (24 aminoácidos), y un gran dominio extracelular (707 aminoácidos). El PSMA contiene Zn en el centro activo de la enzima, por lo que la secuencia Glu-NH-CO-NH-Lys(β -naftil alanina)=Glu-NH-CO-NH-Lys(Nal), se ha propuesto como un inhibidor efectivo de su actividad [Benesová, M, et al. *Preclinical evaluation of a tailor-made DOTA-conjugated PSMA inhibitor with optimized linker moiety for imaging and endoradiotherapy of prostate cancer. J Nucl Med, 56, 2015: 914-920*]. En la interacción química específica, los 3 grupos carboxilo del fragmento Glu-NH-CO-NH -Lys interactúan electrostáticamente con las cadenas laterales peptídicas en el centro activo del PSMA, el oxígeno de la urea se coordina al Zinc y la estructura aromática en Nal interactúa para el acoplamiento con el sitio hidrofóbico activo de la enzima. En estudios clínicos recientes, la aplicación de dos diferentes derivados de inhibidores de PSMA marcados con Lu-177, el ^{177}Lu -PSMA-617 y ^{177}Lu -PSMA-I&T, han demostrado una disminución significativa en los niveles del antígeno prostático (PSA) en el 50-70% de los pacientes con CaP, sin mostrar efectos secundarios severos incrementando significativamente la sobrevida de los pacientes [Ahmadzadehfar H., et al. *Early side effects and first results of radioligand therapy with ^{177}Lu -DKFZ-617 PSMA of castrate-resistant metastatic prostate cancer: a two-centre study. EJNMMI Res. 2015, 5:36*;

- Kratochwil C et al. [^{177}Lu]Lutetium-labelled PSMA ligand-induced remission in a patient with metastatic prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 42, 2015: 987-988; Weineisen M. et al, ^{68}Ga - and ^{177}Lu -Labeled PSMA I&T: Optimization of a PSMA-Targeted Theranostic Concept and First Proof-of-Concept Human Studies. *J Nucl Med* 2015; 56:1169–1176; Baum, R. P., et al. Lutetium-177 PSMA radioligand therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer: safety and efficacy. *J Nucl Med*, 2016, 57:1006-1013; Kratochwil, C, et al. PSMA-targeted radionuclide therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer with Lu-177 labeled PSMA-617. *J Nucl Med*, 2016, 57:1170-1176; Rahbar, K et al. Response and tolerability of a single dose of ^{177}Lu -PSMA-617 in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: a multicenter retrospective analysis. *J Nucl Med*, 2016, 57:1334-1338; Rahbar, K et al. German Multicenter Study Investigating ^{177}Lu -PSMA-617 Radioligand Therapy in Advanced Prostate Cancer Patients. *J Nucl Med*, 2017, 58:85-90]. La proteína PSMA es multifuncional, ya que puede actuar como un receptor de internalización, como una enzima de absorción de nutrientes, o bien como una peptidasa que participa en la transducción de señales en las células epiteliales y en la migración celular [Rajasekaran A. et al. Is prostate-specific membrane antigen a multifunctional protein? *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 2005, 288:C975-C981]. Por ello, los radiofármacos inhibidores de PSMA también pueden utilizarse en otro tipo de neoplasias diferentes al CaP, como en el caso del cáncer de mama metastásico, osteosarcomas, gliomas y cáncer diferenciado de tiroides, entre otros [Ja Fougère, et al. In vivo visualization of prostate-specific membrane antigen in glioblastoma. *Eur J Nucl Med and Mol Imaging*, 2015, 42: 170-171; Verburg FA, et al. First evidence of PSMA expression in differentiated thyroid cancer using [^{68}Ga] PSMA-HBED-CC PET/CT. *Eur J Nucl Med and Mol imaging*, 2015, 42: 1622-1623; Zeng C et al. Prostate-specific membrane antigen: a new potential prognostic marker of osteosarcoma. *Medical Oncology*, 2012, 29: 2234-2239; Sathekge M et al. ^{68}Ga -PSMA imaging of metastatic breast cancer. *Eur J Nucl Med and Mol Imaging*, 2015, 42:1482–1483].

Sin embargo, antes de cualquier tratamiento radioterapéutico, debe evaluarse por imagen nuclear la captación del radiofármaco en los tumores o sus metástasis a fin de confirmar si el tratamiento será o no útil para el paciente, así como para determinar la actividad necesaria a administrar para impartir la dosis de radiación

5 ablativa a los tumores, es decir, se practica la medicina personalizada y la teranóstica. Para ello, es necesario utilizar radiofármacos diagnóstico inhibidores de PSMA con la finalidad de obtener imágenes moleculares por tomografía de emisión de positrones (PET) o por tomografía de emisión de fotón único (SPECT), de los cuales el ^{68}Ga -PSMA-11 (PET) es el más utilizado en la práctica clínica por

10 su alta sensibilidad y especificidad [Eder M et al. *Novel preclinical and radiopharmaceutical aspects of [68Ga]Ga-PSMA-HBED-CC: a new PET tracer for imaging of prostate cancer. Pharmaceuticals*, 2014, 7: 779-796; Eder M et al. *^{68}Ga -complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging. Bioconjugate Chem*, 2012, 23: 688-697; Weineisen et al. *^{68}Ga -and ^{177}Lu -labeled PSMA I&T: optimization of a PSMA-targeted theranostic concept and first proof-of-concept human studies."* *J Nucl Med*, 2015, 56: 1169-1176; Afshar-Oromieh, A., et al. *Comparison of PET/CT and PET/MRI hybrid systems using a ^{68}Ga -labelled PSMA ligand for the diagnosis of recurrent prostate cancer: initial experience. Eur J Nucl Med and Molecular Imaging* 41.5 (2014): 887-

15 897].

20

No obstante, a nivel nacional e internacional, los estudios por SPECT representan más de 70% del total en medicina nuclear por su menor costo y mayor disponibilidad de equipos y radionúclidos, ya que no es necesario tener un ciclotrón dentro de los Hospitales o cercano a éstos. Para imágenes SPECT, el

25 radionúclido más utilizado es el $^{99\text{m}}\text{Tc}$, y recientemente se reportó al $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-IPsMA como un radiofármaco inhibidor del antígeno prostático específico de membrana (IPsMA) que contiene hidrazinonicotinamida (HYNIC) como un grupo químico crítico en el incremento de la lipofilia de la molécula para el acoplamiento a los sitios hidrófobos del PSMA, aunado al uso convencional del

30 HYNIC como un agente quelante para el radiometal $^{99\text{m}}\text{Tc}$, donde el ácido

etilendiaminodiacético (EDDA) es usado para completar la esfera de coordinación del radiometal. El radiofármaco de ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-iPSMA detecta, con alta afinidad *in vivo*, a la proteína PSMA sobre-expresada en células de cáncer de próstata mediante técnicas de imagen molecular SPECT en medicina nuclear

5 [Ferro-Flores G., et al. *Clinical translation of a PSMA inhibitor for ^{99m}Tc -based SPECT*. *Nucl Med Biol*, 2017, 48:36-44; Santos-Cuevas et al. ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-iPSMA: *Biokinetics and Radiation Dosimetry in Healthy Subjects and Tumor Imaging in Patients with Prostate Cancer*. *Nucl Med Biol*, 2017, 52:1-6; Lawal I.O., et al. *Diagnostic sensitivity of Tc-99m HYNIC PSMA SPECT/CT in prostate carcinoma: A comparative analysis with Ga-68 PSMA PET/CT*. *The Prostate*, 2017, 1-8; Ferro-Flores G., et al. ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-iPSMA as a radiopharmaceutical for detecting the overexpression of prostate-specific membrane antigen, WO2017222362, PCT/MX2017/000068].

10

Con la finalidad de desarrollar un par teranóstico para el ligando HYNIC-iPSMA que pueda ser marcado con Lu-177, se propone introducir la molécula DOTA

15 unida al HYNIC, de forma que se genere una estructura química rígida que minimice el número de confórmeros y enlaces de hidrógeno intramoleculares, produciendo una orientación espacial favorable del sitio activo (Lys(Nal)-NH-CO-NH-Glu) de la molécula para el reconocimiento biológico por la proteína PSMA.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se presenta con fines de patente un nuevo radiofármaco de lutecio-177 inhibidor del antígeno prostático específico de membrana (iPSMA) que contiene el

25 ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) unido a la molécula hidrazinonicotinamida (HYNIC) de naturaleza heterocíclica, lo cual genera una estructura química rígida que minimiza el número de confórmeros y enlaces de hidrógeno intramoleculares, produciendo una orientación espacial favorable del sitio activo (Lys(Nal)-NH-CO-NH-Glu) de la molécula para el

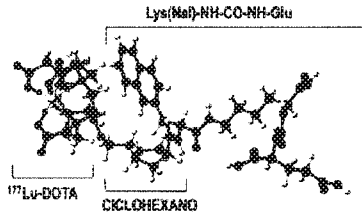
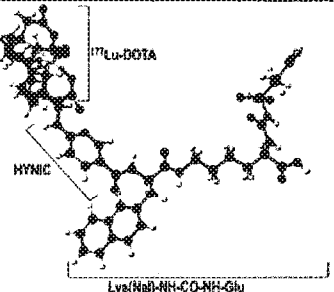
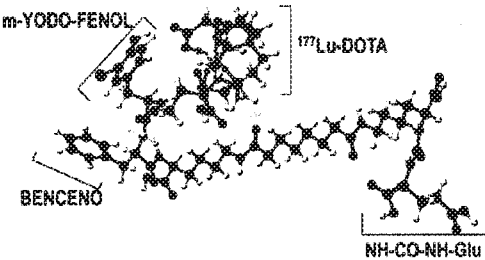
30 reconocimiento biológico por la proteína PSMA. El nuevo radiofármaco de ^{177}Lu -

DOTA-HYNIC-iPSMA se acumula, con alta afinidad *in vivo*, en tumores que sobre-expresan a la proteína PSMA, actuando como un agente radioterapéutico. En la **figura 1** se muestra esquemáticamente la estructura del radiofármaco a patentar (^{177}Lu -DOTA-HYNIC-iPSMA).

- 5 Basados en el conocimiento básico de que por su naturaleza heterocíclica la piridina tiene un momento dipolar y una energía de resonancia menor a la del benceno ($117 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para la piridina frente a $150 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para el benceno), así como una menor longitud del enlace C-N (137 pm) frente a 139 pm para el enlace C-C en el benceno y ciclohexano [Elschenbroich C. *Organometallchemie*, 6th ed.,
- 10 2008, ISBN 3-8351-0167-6], se diseñó y sintetizó el derivado ^{177}Lu -DOTA-HYNIC-iPSMA para obtener una estructura química poco reactiva y rígida en la región del HYNIC que minimice el número de conformeros y enlaces de hidrógeno intramoleculares con respecto a los derivados ^{177}Lu -PSMA-617 y ^{177}Lu -PSMA-I&T. En la tabla 1 siguiente se presenta para los diferentes inhibidores de PSMA, los
- 15 resultados comparativos de sus propiedades moleculares y geometrías estructurales óptimas. Los ligandos PSMA-617, DOTA-HYNIC-iPSMA, y PSMA-I&T se construyeron teniendo en cuenta la valencia, el tipo de enlace, la carga y la hibridación. Las energías mínimas (procedimiento MM3 aumentado) y el conformero de energía más bajo (procedimiento CONFLEX) asociado a la
- 20 geometría óptima de sus estructuras, se obtuvieron utilizando el software CAChe Work System Pro. Las estructuras geométricas óptimas se confirmaron mediante métodos mecánico- cuánticos usando la ecuación de Schrödinger con MOPAC (orbital molecular) que calcula el calor de la formación en agua (COSMO). A partir de ellas se construyeron los complejos con Lutecio y se presentan los resultados
- 25 de MM3 (mecánica molecular) aumentado, CONFLEX y la estructura de la geometría más estable y óptima para los radiofármacos Lu-PSMA-617 y Lu DOTA-HYNIC-iPSMA y Lu-PSMA-I&T. En la tabla 1 se observa que la molécula Lu-DOTA-HYNIC-iPSMA es más estable que la de Lu-PSMA-617 de acuerdo con la energía del conformero más estable (menor energía) y al menor número total de
- 30 conformeros; así como la formación de menos enlaces de hidrógeno en Lu-DOTA-

HYNIC-iPSMA respecto a Lu-PSMA-617 y Lu-PSMA-I&T. Es importante enfatizar que los enlaces de hidrógeno juegan un papel crucial para la conformación espacial, ya que, aunque el

TABLA 1. PROPIEDADES MOLECULARES DE TRES LIGANDOS INHIBIDORES DE LA PROTEÍNA PSMA CON CAPTACIÓN TUMORAL Y EFECTO RADIOTERAPÉUTICO DEMOSTRADO EN ESTUDIOS CLÍNICOS CUANDO SE COORDINAN AL Lu-177

CÁLCULO (kcal/mol)	PSMA-617	Lu-PSMA-617	DOTA-HYNIC- IP SMA	Lu-DOTA- HYNIC-IP SMA	PSMA-I&T	Lu-PSMA-I&T
Energía mínima (MM3)	87.795	<u>-49.038</u>	106.412	<u>-76.360</u>	105.652	<u>-61.031</u>
Carga electrostática	-20.447	-197.887	-10.061	-206.795	-22.131	-210.822
Enlace de hidrógeno	25.317	<u>27.070</u>	22.253	<u>19.984</u>	27.304	<u>35.499</u>
van der Waals	45.571	<u>58.033</u>	50.036	71.704	50.840	<u>127.435</u>
Tensión (stretch)	6.994	10.184	7.398	26.970	9.471	50.100
Angulo	16.360	35.203	20.704	84.579	20.504	143.558
Tensión de flexión	0.937	1.196	1.117	4.282	1.180	8.849
Dihedral	14.232	32.247	15.863	42.282	20.508	83.716
Torsión impropia	0.173	0.375	0.264	0.290	0.207	1.064
Tensión de torsión	-1.268	-1.925	-1.159	-3.269	-1.803	-6.234
Flexión flexión	-0.154	0.841	-0.003	3.044	-0.426	8.513
CONFLEX						
Energía del conformero más estable	74.127	<u>-48.229</u>	78.386	<u>-76.241</u>	39.006	<u>-275.044</u>
No. de conformeros almacenados	1131	<u>46</u>	438	<u>24</u>	498	<u>9</u>
MOPAC/PM5 (calor de formación)	-715.945		-623.942		-1033.201	
MOPAC/PM5/COSMO (calor de formación en agua)	-788.083		-698.534		-1136.015	
Geometría óptima del radiofármaco Lu-PSMA-617	 177Lu-DOTA CICLOHEXANO Lys(Nal)-NH-CO-NH-Glu					
Geometría óptima del radiofármaco Lu-DOTA-HYNIC-IP SMA	 177Lu-DOTA HYNIC Lys(Nal)-NH-CO-NH-Glu					
Geometría óptima del radiofármaco Lu-PSMA-I&T	 m-YODO-FENOL BENCENO 177Lu-DOTA NH-CO-NH-Glu					

Lu-PSMA-I&T presenta el menor número de conformeros con la menor energía mínima, en su conformación se ven comprometidos los anillos hidrófobos de la molécula al orientarse, debido sustancialmente a dichas interacciones débiles de hidrógeno, hacia el anillo ^{177}Lu -DOTA (interacciones benceno-[m-yodo-fenol]- ^{177}Lu -DOTA). Por ello, las geometrías estructurales óptimas de los diferentes radiofármacos presentadas en la tabla 1, indican una conformación espacial conveniente para el Lu-DOTA-HYNIC-iPSMA, donde se produce una orientación espacial favorable (sin interacciones intramoleculares significativas) del sitio activo (Lys(Nal)-NH-CO-NH-Glu) de la molécula para el reconocimiento biológico por la proteína PSMA. Es decir, los 3 grupos carboxilo del fragmento Glu-NH-CO-NH-Lys quedan libres para interactuar electrostáticamente con las cadenas laterales peptídicas en el centro activo del PSMA, el oxígeno de la urea para coordinarse al Zinc y la estructura aromática en Nal para el acoplamiento con el sitio hidrofóbico activo de la enzima.

Por otro lado, en la estructura del radiofármaco a patentar, el HYNIC no se utiliza como una molécula para quelar al radiometal, mientras que en otros radiofármacos, el HYNIC se utiliza exclusivamente como agente bifuncional para el marcado con ^{99m}Tc [Decristoforo C et al ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-TOC: a new ^{99m}Tc -labelled radiopharmaceutical for imaging somatostatin receptor-positive tumours; first clinical results and intra-patient comparison with ^{111}In -labelled octreotide derivatives, 2000, J Nucl Med 27;1318-25; Ferro-Flores G et al. Preparation and Evaluation of ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-[Lys³]-Bombesin for Imaging of GRP Receptor-Positive Tumours. Nucl Med Comm, 2006, 27:371-376; González-Vázquez A et al. Dosimetry and Biokinetics of ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-Tyr³-Octreotide Prepared from Lyophilized Kits. Appl Rad Isot, 2006, 64: 792-79; Ortiz-Arzate Z et al. Kit preparation and biokinetics in women of ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ for breast cancer imaging. Nucl Med Commun, 2014, 35:423-32; Medina-García V et al. A Freeze-Dried Kit Formulation for the Preparation of Lys²⁷(^{99m}Tc -EDDA/HYNIC)-Exendin(9-39)/ ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-Tyr³-Octreotide to Detect Benign and Malignant Insulinomas. Nucl Med Biol, 2015, 42: 911-916].

Método de preparación del radiofármaco de la invención

Para la síntesis de la molécula se utilizó inicialmente el di-*ter*-butil éster del ácido

5 gultámico, el cual se hizo reaccionar con carbonildiimidazol (CDI) en presencia de trietilamina (TEA) para formar el derivado acilimidazol, el cual se activó con metil triflato (MeOTf) para reaccionar con el (*S*)-*ter*-butil-2-amino-6-(benciloxycarbonilamino) hexanoato (Cbz-Lys-Of-Bu) con posterior desprotección del Cbz via hidrogenólisis, obteniendo así el derivado Glu-Urea-Lys, el cual se hizo
10 reaccionar en fase sólida (resina MBHA) con el aminoácido Fmoc-β-naftil alanina (HBTU/HOBt), seguido del ácido 6-Boc-hidrazinopiridin-3-carboxílico (Boc-HYNIC) en presencia de diisopropiletilenamina (DIPEA) y dimetilformamida (DMF) y posterior adición de TFA. Este último paso de adición se repitió para la introducción de DOTA-tris (t-Bu éster). Finalmente, el compuesto se desprotegió
15 con TFA, se purificó por HPLC y se liofilizó. El producto final fue el Glu-NH-CO-NH-Lys(β-naftil alanina)-HYNIC-DOTA (DOTA-HYNIC-iPSMA), que presentó el espectro de masas esperado que se muestra en la **figura 2**. El análisis por HPLC en fase reversa del sólido blanco liofilizado mostró una pureza química del compuesto del 98.8%.

20 El DOTA-HYNIC-iPSMA (0.6 mg) se formuló como una forma farmacéutica liofilizada conteniendo 50 mg de manitol y 100 mg de ácido ascórbico. Dicha formulación, después de ser reconstituido con 1.1 mL de buffer de acetato de sodio 1 M, pH 5.0, conteniendo la solución estéril y libre de pirógenos de cloruro de lutecio-177 (¹⁷⁷LuCl₃) e incubación de 30 min en un baño seco a 95°C, provee
25 una solución acuosa transparente del compuesto a patentar ¹⁷⁷Lu-DOTA-HYNIC-iPSMA (figura 1) con una pureza radioquímica mayor al 98% determinada por HPLC de fase reversa que presenta el radiocromatograma de la **figura 3**.

El radiofármaco se mantiene estable con una pureza radioquímica mayor al 98% después de 7 días de marcado. Las pruebas *in vitro* de estabilidad en suero
30 humano muestran una unión a proteínas séricas de 6.5 ± 1.8 % y una alta

estabilidad radioquímica (>98%). La afinidad del ^{177}Lu -DOTA-HYNIC-IPsMA, determinada por estudios de saturación en células de cáncer positivas a la proteína PSMA (LNCaP), mostró un K_d de 6.33 ± 2.69 nM, y un número máximo de sitios de unión (B_{max}) de 5.89 ± 0.47 nM.

- 5 El compuesto no presentó toxicidad ni efectos adversos cuando se administró a una dosis de 40 mg/kg en ratones balb-C de laboratorio. Las pruebas de biodistribución del ^{177}Lu -DOTA-HYNIC-IPsMA en ratones atímicos con tumores inducidos LNCaP, mostraron una captación en los tumores de 9.74 ± 1.13 % de la actividad administrada por gramo de tejido (%ID/g) con vía de eliminación
10 principalmente renal.

- Para determinar la biocinética y dosimetría del radiofármaco, se adquirieron imágenes de cuerpo entero de cinco sujetos sanos a los 20 min, 6, 24, 48 y 120 h después de la administración de ^{177}Lu -DOTA-HYNIC-IPsMA (185 MBq). La secuencia de imágenes se usó para extrapolar las curvas de tiempo-actividad en
15 cada órgano para ajustar el modelo biocinético y calcular el número total de desintegraciones (N) que ocurrieron en las regiones fuente. Los datos N se utilizaron en el código OLINDA/EXM para calcular las dosis de radiación interna. Las imágenes en voluntarios sanos, muestran una rápida depuración sanguínea, con un valor de vida media de 1.1 h para el componente rápido ($T_{1/2\alpha} = \ln 2/0.614$),
20 9.2 h para el primer componente lento ($T_{1/2\beta} = \ln 2/0.075$) y 79.6 h para el segundo componente lento ($T_{1/2\gamma} = \ln 2/0.008$). La mayor captación y excreción es renal, con menor captación hepática y alta captación en glándulas paratiroides, salivales y lagrimales. Las dosis promedio absorbidas fueron 0.23, 0.28, 0.88 y 1.17 mGy/MBq para el bazo, el hígado, el riñón y las glándulas salivales, respectivamente.

- 25 Para evaluar el potencial radioterapéutico, se administró a once pacientes (edad media: 66 años, rango 45-86) de 1 a 4 ciclos de ^{177}Lu -DOTA-HYNIC-IPsMA (3.7 o 7.4 GBq) cada 8-10 semanas. La respuesta se evaluó utilizando imágenes con ^{68}Ga -PSMA-11 PET/CT (radiofármaco con probada afinidad en la práctica clínica y técnica de alta resolución para la detección de lesiones metastásicas
30 de cáncer de próstata) y determinando los niveles séricos del antígeno prostático

específico (PSA) antes y después del tratamiento. El 60% de los pacientes tuvieron una disminución del PSA y el 70% una reducción en el número y tamaño de lesiones metastásicas y/o en la intensidad de captación de radiofármaco en las metástasis y tumor primario determinado por imagen.

- 5 La **figura 4** muestra una imagen SPECT del radiofármaco ^{177}Lu -DOTA-HYNIC-iPSMA obtenida en un voluntario sano a diferentes tiempos. La **figura 5** muestra una imagen de PET y SPECT del mismo paciente con cáncer de próstata metastásico avanzado al que se le administró tanto ^{68}Ga -PSMA-11 (PET, 1 h) como ^{177}Lu -DOTA-HYNIC-iPSMA (SPECT, 24 h), mostrando que ambos
- 10 radiofármacos detectan con alta sensibilidad los tumores y metástasis de cáncer de próstata, asociado al reconocimiento de la sobre-expresión del PSMA; confirmando la capacidad del radiofármaco ^{177}Lu -DOTA-HYNIC-iPSMA para detectar *in vivo* al PSMA sobre-expresado en las células de cáncer de próstata. Finalmente, la **figura 6** muestra las imágenes de un paciente con cáncer de
- 15 próstata metastásico después del tercer ciclo de tratamiento con ^{177}Lu -DOTA-HYNIC-iPSMA. El seguimiento por imagen con ^{68}Ga -PSMA-11 (PET) muestra que los sitios de lesión metastásica de cáncer de próstata (señalado con flechas), disminuyen en tamaño y número después de cada administración del ^{177}Lu -DOTA-HYNIC-iPSMA hasta su completa eliminación. Esta imagen confirma y es la
- 20 principal evidencia, del potencial radioterapéutico del ^{177}Lu -DOTA-HYNIC-iPSMA en el tratamiento de lesiones tumorales que sobre-expresan PSMA.

Concluyendo, el ^{177}Lu -DOTA-HYNIC-iPSMA se obtiene con las siguientes características:

- Pureza radioquímica mayor al 98%
- 25 • Capacidad del radiofármaco para detectar *in vivo* a tumores que sobre-expresan el antígeno prostático específico de membrana, asociado a una orientación espacial favorable del sitio activo (Lys(Nal)-NH-CO-NH-Glu) de la molécula inducida por la presencia del HYNIC unido a la molécula DOTA.
- Debido al reconocimiento molecular asociado a una orientación espacial
- 30 favorable del sitio activo (Lys(Nal)-NH-CO-NH-Glu) de la molécula inducida por la

presencia del HYNIC unido a la molécula DOTA y marcada con lutecio-177, el radiofármaco ^{177}Lu -DOTA-HYNIC-IPsMA presenta propiedades radioterapéuticas que se demuestran en la reducción significativa de los niveles de PSA en suero, así como una disminución en el número y tamaño de lesiones metastásicas

5 observadas en los pacientes con cáncer de próstata tratados con ^{177}Lu -DOTA-HYNIC-IPsMA.

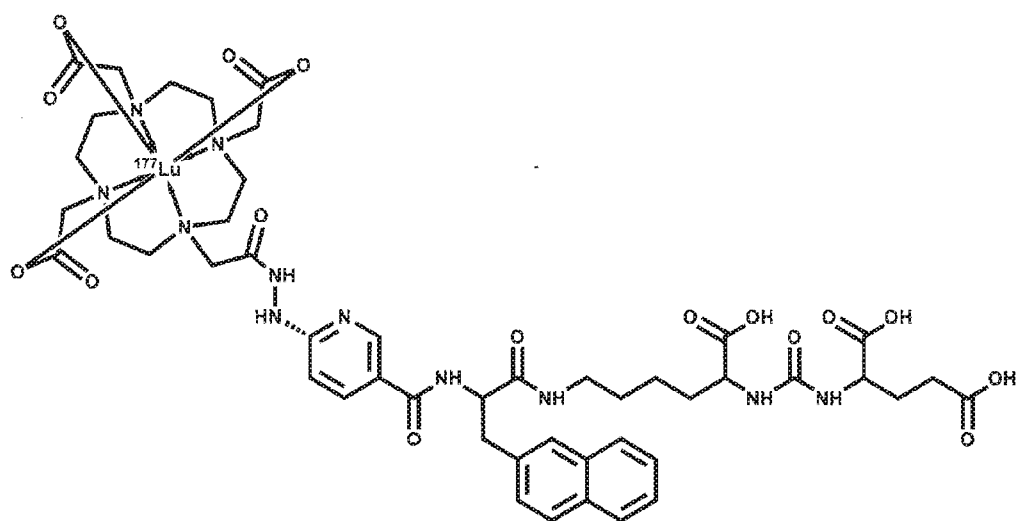


Figura 1

2/6

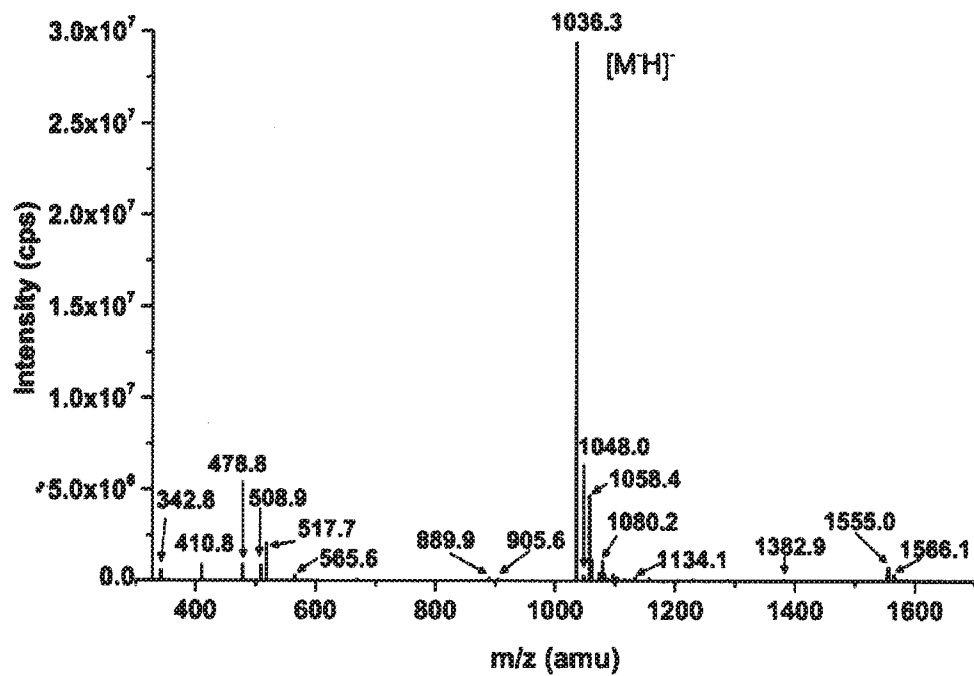
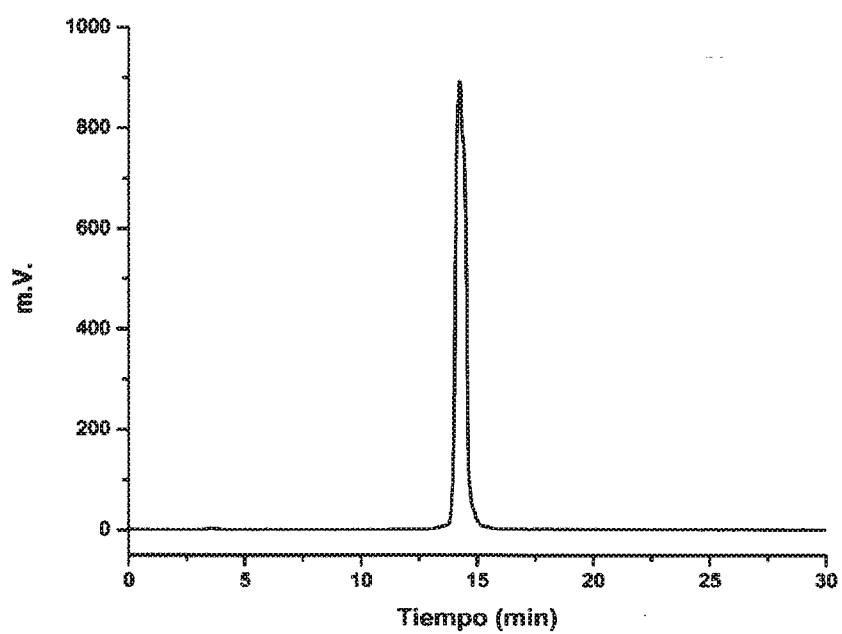


Figura 2

3/6

**Figura 3**

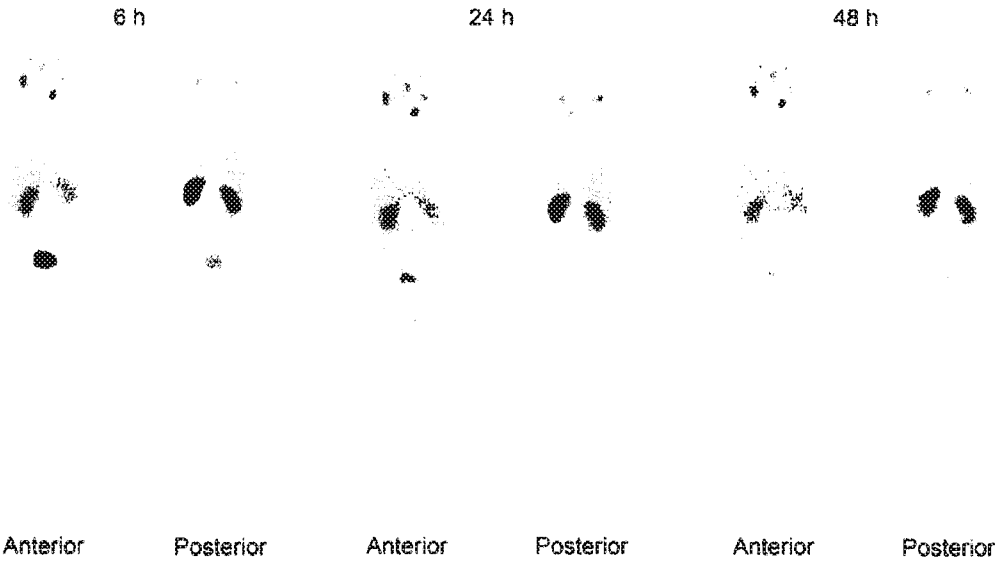


Figura 4

^{68}Ga -PSMA-11



^{177}Lu -DOTA-HYNIC-iPSMA



Figura 5

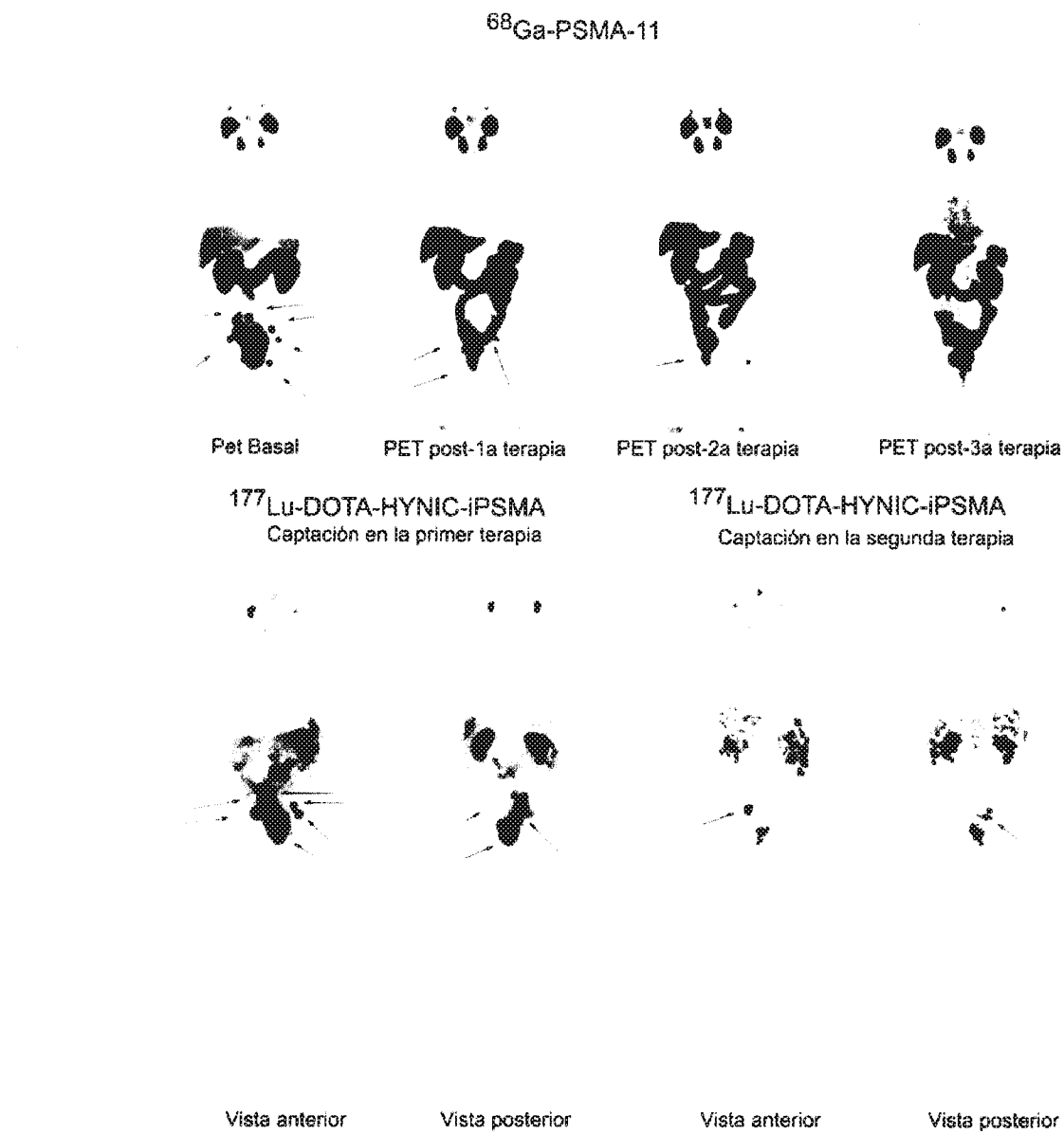


Figura 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/MX2019/000025

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07F, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, CAS, PUBCHEM, PUBMED

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2017222362 A1 (INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES) 28/12/2017 the whole document	1-3
A	XIAOPING XU et al. Tc-99m-labeling and evaluation of a HYNIC modified small-molecular inhibitor of prostate-specific membrane antigen. Nuclear Medicine and Biology, 2017, Vol. 48, Pages 69-75, the whole document	1-3
A	G FERRO-FLORES et al. Clinical translation of a PSMA inhibitor for Tc-99m-based SPECT. Nuclear Medicine and Biology, 2017, Vol. 48, Pages 36-44	1-3
A	WO 2016043793 A2 (THE SOUTH AFRICAN NUCLEAR ENERGY CORP Y UNIVERSITY OF CAPE TOWN) 31/03/2016,	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11/06/2019

Date of mailing of the international search report
(21/06/2019)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer

M. Fernández Fernández

Telephone No. 91 3495489

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/MX2019/000025

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2017222362 A1	28.12.2017	CN109641924 A MX2016008466 A EP3486249 A1	16.04.2019 25.12.2017 22.05.2019
-----	-----	-----	-----
WO2016046793 A2	31.03.2016	RU2017114360 A RU2017114360 A3 BR112017005985 A2 MX2017003886 A JP2017530131 A US2017296684 A1 KR20170095810 A CN107106709 A AR102105 A1 AU2015323328 A1 CA2962525 A1 EP3197504 A2	26.10.2018 04.04.2019 19.12.2017 12.01.2018 12.10.2017 19.10.2017 23.08.2017 29.08.2017 01.02.2017 04.05.2017 31.03.2016 02.08.2017 -----
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/MX2019/000025

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07F13/00 (2006.01)

A61K51/04 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/MX2019/000025

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C07F, A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, CAS, PUBCHEM, PUBMED

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	WO 2017222362 A1 (INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES) 28/12/2017 todo el documento	1-3
A	XIAOPING XU et al. Tc-99m-labeling and evaluation of a HYNIC modified small-molecular inhibitor of prostate-specific membrane antigen . Nuclear Medicine and Biology, 2017, Vol. 48, Páginas 69-75 todo el documento	1-3
A	G FERRO-FLORES et al. Clinical translation of a PSMA inhibitor for Tc-99m-based SPECT. Nuclear Medicine and Biology, 2017, Vol. 48, Páginas 36-44	1-3
A	WO 2016043793 A2 (THE SOUTH AFRICAN NUCLEAR ENERGY CORP Y UNIVERSITY OF CAPE TOWN) 31/03/2016,	1-3

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
11/06/2019

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
21 de junio de 2019 (21/06/2019)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
N° de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. Fernández Fernández
N° de teléfono 91 3495489

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/MX2019/000025

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2017222362 A1	28.12.2017	CN109641924 A MX2016008466 A EP3486249 A1	16.04.2019 25.12.2017 22.05.2019
-----	-----	-----	-----
WO2016046793 A2	31.03.2016	RU2017114360 A RU2017114360 A3 BR112017005985 A2 MX2017003886 A JP2017530131 A US2017296684 A1 KR20170095810 A CN107106709 A AR102105 A1 AU2015323328 A1 CA2962525 A1 EP3197504 A2	26.10.2018 04.04.2019 19.12.2017 12.01.2018 12.10.2017 19.10.2017 23.08.2017 29.08.2017 01.02.2017 04.05.2017 31.03.2016 02.08.2017
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C07F13/00 (2006.01)

A61K51/04 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)