

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 861 528**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

C07D 209/20 (2006.01)

C07K 5/062 (2006.01)

C07K 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2016 PCT/US2016/050709**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.03.2017 WO17044584**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2016 E 16845024 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2021 EP 3347019**

54 Título: **Colorantes del NIR dirigidos al PSMA y sus usos**

30 Prioridad:

09.09.2015 US 201562216157 P

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

06.10.2021

73 Titular/es:

**ON TARGET LABORATORIES, LLC (100.0%)
Kurtz Purdue Technology Center 1281 Win
Hentschel Blvd.
West Lafayette, Indiana 47906, US**

72 Inventor/es:

**KULARATNE, SUMITH A.;
LOW, PHILIP S.;
GAGARE, PRAVIN y
MYERS, CARRIE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 861 528 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

Colorantes del NIR dirigidos al PSMA y sus usos

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere a colorantes del infrarrojo cercano (NIR) dirigidos al antígeno de membrana prostático específico (PSMA) y a su uso terapéutico y diagnóstico. Más específicamente, esta divulgación proporciona compuestos y su uso en el diagnóstico y la extirpación quirúrgica (cirugía guiada por imagen) de células que expresan el antígeno de membrana prostático específico (PSMA), tales como las del cáncer de próstata y enfermedades relacionadas. La divulgación describe además composiciones para la elaboración y el uso de los compuestos y kits que incorporan los compuestos.

15 **Antecedentes de la invención**

La próstata es uno de los órganos genitales masculinos que se encuentra en la pelvis debajo de la vejiga urinaria. Su función es producir y almacenar el semen, que proporciona nutrientes y líquidos que son vitales para la supervivencia del esperma que se introduce en la vagina durante la reproducción. Al igual que otros muchos tejidos, las próstatas también tienden a desarrollar tumores tanto malignos (cancerosos) como benignos (no cancerosos). La American Cancer Society predijo que a más de 230.000 hombres se les diagnosticaría cáncer de próstata, y más 30.000 hombres morirían por la enfermedad en el año 2005. De hecho, el cáncer de próstata es uno de los cánceres masculinos más habituales en las sociedades occidentales, y es la segunda causa de cáncer en los varones estadounidenses. Los métodos de tratamiento actuales para el cáncer de próstata incluyen terapia hormonal, radioterapia, cirugía, quimioterapia, terapia fotodinámica y politerapia. La selección del tratamiento generalmente varía dependiendo de la fase del cáncer. Sin embargo, muchos de estos tratamientos afectan a la calidad de vida del paciente, especialmente a aquellos hombres a los que se les diagnostica cáncer de próstata con más de 50 años. Por ejemplo, el uso de fármacos hormonales a menudo está acompañado por efectos secundarios tales como osteoporosis y daño hepático. Dichos efectos secundarios podrían mitigarse mediante el uso de tratamientos que sean más selectivos o específicos sobre el tejido responsable del estado patológico, y eviten tejidos no objetivo como los huesos o el hígado. Como se describe en el presente documento, el antígeno de membrana prostático específico (PSMA) representa un objetivo para dichos tratamientos selectivos o específicos.

La extirpación quirúrgica de una neoplasia maligna constituye uno de los tratamientos más habituales y eficaces en el tratamiento primario del cáncer. La resección de todas las lesiones malignas detectables hace que no haya recurrencias detectables de la enfermedad en aproximadamente el 50 % de todos los pacientes con cáncer, y puede prolongar la esperanza de vida o reducir la morbilidad de los pacientes en los que se observa una recidiva del cáncer. No es sorprendente que los métodos quirúrgicos para conseguir una citorreducción más cuantitativa estén recibiendo ahora más atención.

La resección de todas las lesiones malignas detectables hace que no haya recurrencias detectables de la enfermedad en aproximadamente el 50 % de todos los pacientes con cáncer, y puede prolongar la esperanza de vida o reducir la morbilidad de los pacientes en los que se observa una recidiva del cáncer. Dada la importancia de la total resección de las lesiones malignas, es beneficioso asegurarse de que las lesiones malignas se identifican de forma precisa y completa. La identificación del tejido maligno durante la cirugía actualmente se consigue mediante tres métodos. En primer lugar, muchas masas y nódulos tumorales pueden detectarse visualmente sobre la base de un color, una textura y/o una morfología anormales. Por lo tanto, una masa tumoral puede mostrar un color variado, tener un aspecto asimétrico con un borde irregular o sobresalir del contorno del órgano sano. Una masa maligna también puede reconocerse por el tacto debido a diferencias en la plasticidad, la elasticidad o la solidez con respecto a los tejidos sanos adyacentes. Por último, pueden localizarse unos pocos focos de cáncer en el periodo intraoperatorio usando colorantes fluorescentes que fluyen de forma pasiva desde el tumor primario hacia los ganglios linfáticos de drenaje. En esta última metodología, los ganglios linfáticos fluorescentes (centinela) pueden identificarse visualmente, extirparse y analizarse para determinar si las células cancerosas han metastatizado a estos ganglios linfáticos.

El PSMA se denomina así debido fundamentalmente a su mayor nivel de expresión en las células de cáncer de próstata; sin embargo, sigue sin resolverse su función particular en las células del cáncer de próstata. El PSMA está sobreexpresado en los tejidos prostáticos malignos cuando se compara con otros órganos del cuerpo humano tales como el riñón, el intestino delgado proximal y las glándulas salivales. El PSMA también se expresa en la neovasculatura de la mayoría de los tumores sólidos. Aunque el PSMA se expresa en el cerebro, esa expresión es mínima, y la mayoría de los ligandos del PSMA son polares y no son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. El PSMA es una glicoproteína de tipo II de la superficie celular unida a la membrana con un peso molecular de - 110 kD, que incluye un segmento intracelular (aminoácidos 1-18), un dominio transmembranario (aminoácidos 19-43) y un amplio dominio extracelular (aminoácidos 44-750). Aunque actualmente se cree que las funciones del segmento intracelular y los dominios transmembranarios son insignificantes, el dominio extracelular está implicado en varias actividades distintas. El PSMA desempeña una función en el sistema nervioso central, donde metaboliza el N-acetil-aspartil glutamato (NAAG) en ácido glutámico y N-acetil aspártico. Por consiguiente, también se denomina en ocasiones alfa-N-acetil dipeptidasa ácida (NAALADasa). El PSMA también se denomina en ocasiones hidrolasa de

folato I (FOLH I) o carboxipeptidasa de glutamato (GCP II) debido a su función en el intestino delgado proximal, donde elimina el γ -glutamato del folato poli- γ -glutamatado y el glutamato no unido de péptidos y moléculas pequeñas.

El PSMA también comparte similitudes con el receptor de la transferrina humano (TfR), debido a que tanto el PSMA como el TfR son glicoproteínas de tipo II. Más específicamente, El PSMA muestra una homología del 54 % y del 60 % con el TfR1 y el TfR2, respectivamente. Sin embargo, aunque el TfR existe únicamente en forma dimérica debido a la formación de enlaces de sulfhidrilo o intercatenarios, puede existir tanto en forma dimérica como en forma monomérica.

Al contrario que otras muchas proteínas unidas a la membrana, el PSMA experimenta una rápida internalización en la célula de una forma similar a los receptores unidos a la superficie celular, como los receptores de vitaminas. El PSMA se internaliza a través de microcavidades recubiertas con clatrina y posteriormente puede reciclarse a la superficie celular o ir a los lisosomas. Se ha sugerido que la forma dimérica y monomérica del PSMA son interconvertibles, aunque se están debatiendo las pruebas directas de la interconversión. Aun así, únicamente el dímero del PSMA posee actividad enzimática, y el monómero no la tiene.

Aunque la función del PSMA en la superficie celular de las células del cáncer de próstata sigue siendo desconocida, se ha reconocido que el PSMA representa un objetivo viable para la administración selectiva y/o específica de agentes biológicamente activos, incluyendo agentes de diagnóstico, agentes de obtención de imágenes y agentes terapéuticos para dichas células de cáncer de próstata.

El radioinmunoconjugado del anticuerpo monoclonal (Acm) anti-PSMA, 7E11, conocido como escáner de PROSTASCINT®, se está usando actualmente para diagnosticar la metástasis y la recidiva del cáncer de próstata. Sin embargo, este agente tiende a producir imágenes que son difíciles de interpretar (Lange, P.H. PROSTASCINT scan for staging prostate cancer. *Urology* 2001, 57, 402-406; Haseman, M.K.; *et al.* *Cancer Biother Radiopharm* 2000, 15, 131-140; Rosenthal, S.A.; *et al.* *Tech Urol* 2001, 7, 27-37). Se une a un epítipo intracelular del PSMA en células de cáncer de próstata necróticas. Más recientemente, se han desarrollado anticuerpos monoclonales que se unen al dominio extracelular del PSMA y se han radiomarcado, y se ha demostrado que se acumulan en modelos de tumores de próstata positivos para el PSMA en animales. Sin embargo, el diagnóstico y la detección de tumores usando anticuerpos monoclonales han estado limitados por la baja permeabilidad debido a su gran tamaño (150.000 Da) y a su lenta eliminación del tejido no objetivo. Además, el direccionamiento selectivo de radioagentes o de agentes ópticos de obtención de imágenes tanto para la obtención de imágenes como para fines terapéuticos es complicado debido a su larga semivida (~30 días). Especialmente, los pacientes deben permanecer en el hospital durante más días y gastar más dinero en facturas médicas.

Actualmente se están investigando intensamente dos estrategias prometedoras de cirugía guiada por fluorescencia para su uso en clínica. En un método, una sonda fluorescente en NIR activable, que es mínimamente fluorescente en la situación de equilibrio debido a su proximidad a un inactivador unido, se vuelve muy fluorescente tras la liberación del inactivador en el tejido maligno. Uno de los mecanismos de liberación usados más habitualmente implica la incorporación de una secuencia peptídica entre el colorante y el inactivador que pueda ser escindida específicamente por una proteasa abundante en el tumor (es decir, catepsinas, caspasas y metaloproteinasas de la matriz). Un importante ventaja de esta estrategia se basa en la ausencia de fluorescencia en los tejidos que carecen de la enzima de activación, lo que permite que los tejidos a lo largo de la ruta de excreción (por ejemplo, los riñones, la vejiga, el hígado) permanezcan sin fluorescencia hasta que expresen accidentalmente la enzima de escisión. Dichos colorantes del NIR activados en el tumor también pueden generar una fluorescencia importante en la masa tumoral siempre que la lesión maligna tenga abundancia de la proteasa de escisión y el colorante liberado quede retenido en el tumor. El mayor inconveniente de esta metodología surge por las bajas especificidades tumorales de muchas de las hidrolasas relevantes (la mayoría de las cuales también se expresan en los tejidos sanos que experimentan un remodelado natural o que sufren una inflamación). Además, la abundancia de las proteasas deseadas puede variar entre las masas tumorales, dando lugar a una activación baja o nula de la fluorescencia en algunas lesiones malignas y al rápido desarrollo de fluorescencia en otras. La mayor parte del tiempo, estos péptidos activables contienen más de 20 aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos que podrían dar lugar a unos pesos moleculares mayores, un tiempo de anticipación diagnóstica más largo (24 h), la escisión de los enlaces peptídicos por parte de las peptidasas de la circulación, muchos resultados falsos positivos y unos costes de elaboración y muy altos.

Otros mecanismos de liberación que usan los colorantes activables son la diferencia de pH entre la circulación y el interior del tumor o el cambio en el potencial de oxidorreducción.

En segundo lugar, se conjuga un colorante fluorescente con un ligando de direccionamiento específico del tumor que hace que el colorante unido se acumule en los cánceres que sobreexpresan el receptor del ligando. Aunque los conjugados de anticuerpo-colorante del NIR dirigidos al PSMA no se han incorporado todavía a los ensayos clínicos de cirugía oncológica guiada por fluorescencia, se han conjugado varios tipos de colorantes del NIR con anticuerpos monoclonales tales como Her-2 con el propósito del desarrollo clínico. Desafortunadamente, la mayoría de estos colorantes están anclados a anticuerpos de forma no específica a través de una química de amida, disulfuro o maleimida que utiliza restos de lisina o de cisteína en la proteína, dando lugar a entidades químicas heterogéneas que dan como resultado afinidades, eficacias, farmacocinéticas y perfiles de seguridad variables. Además, se sabe que los enlaces maleimida y disulfuro son inestables en la circulación (semivida \leq 2 h). Por otro lado, la ausencia de una

definición estructural precisa puede limitar la progresión de estos conjugados en el uso clínico debido a las dificultades asociadas con el proceso de producción y la seguridad. Además, la producción de estos anticuerpos es muy cara cuando se compara con ligandos de molécula pequeña. Por el contrario, un ligando de molécula pequeña ($M_r > 0,5 \text{ Da}$) puede penetrar rápidamente en los tumores sólidos y se elimina de los tejidos negativos para el PSMA en $< 2 \text{ h}$, muestra elevadas relaciones entre el tumor y la señal de fondo, es fácil de sintetizar y es estable durante la síntesis y la conservación.

A pesar de todas las ventajas que presentan esos ligandos de molécula pequeña, todavía es complicado el desarrollo de un colorante del NIR que mantenga o mejore las propiedades de la molécula pequeña. Recientemente, se han conjugado diversos inhibidores del PSMA de bajo peso molecular con colorantes de longitud de onda visible (400-600 nm) tales como fluoresceína y rodamina y se han analizado en modelos de animal [Kularatne SA, Wang K, Santhapuram HK, Low PS. *Mol Pharm.* mayo-junio de 2009; 6 (3): 780-9] o en células en cultivo [Liu T, Nedrow-Byers JR, Hopkins MR, Berkman CE. *Bioorg Med Chem Lett.* 1 de diciembre de 2011; 21 (23)] o en muestras de sangre humana (He W, Kularatne SA, Kalli KR, Prendergast FG, Amato RJ, Klee GG, Hartmann LC, Low PS. *Int J Cancer.* 15 de oct de 2008; 123 (8):1968-73).

Los colorantes de longitud de onda de luz visible no son óptimos para la cirugía guiada por imagen intraoperatoria, ya que estos colorantes están asociados con un nivel relativamente alto de luz de fondo no específica debido a la presencia de colágeno en los tejidos. Por tanto, la relación entre señal y ruido de estos compuestos convencionales es baja. Además, la absorción de luz visible por parte de cromóforos biológicos, en particular, hemoglobina, limita la profundidad de penetración a unos pocos milímetros. Por tanto, normalmente quedan sin detectar los tumores que están a más profundidad que unos pocos milímetros en el tejido. Además, el equilibrio de ionización de la fluoresceína ($pK_a = 6,4$) da lugar a una absorción y una emisión dependientes del pH a lo largo del intervalo de 5 a 9. Por lo tanto, la fluorescencia de los colorantes basados en fluoresceína se inactiva a un pH bajo (por debajo de pH 5).

Por lo tanto, los colorantes del NIR conjugados con ligandos de molécula pequeña que se dirigen al PSMA [(a) Humblet V, Lapidus R, Williams LR, Tsukamoto T, Rojas C, Majer P, Hin B, Ohnishi S, De Grand AM, Zaheer A, Renze JT, Nakayama A, Slusher BS, Frangioni JV. *Mol Imaging.* octubre-diciembre de 2005; 4 (4): 448-62; (b) Thomas M, Kularatne SA, Qi L, Kleindl P, Leamon CP, Hansen MJ, Low PS.; (c) Chen Y, Dhara S, Banerjee SR, Byun Y, Pullambhatla M, Mease RC, Pomper MG. *Biochem Biophys Res Commun.* 18 de diciembre de 2009; 390 (3): 624-9; (d) Nakajima T, Mitsunaga M, Bander NH, Heston WD, Choyke PL, Kobayashi H. *Bioconjug Chem.* 17 de agosto 2011; 22 (8):1700-5; (e) Chen Y, Pullambhatla M, Banerjee SR, Byun Y, Stathis M, Rojas C, Slusher BS, Mease RC, Pomper MG. *Bioconjug Chem.* 19 de diciembre de 2012; 23 (12): 2377-85; (f) Laydner H, Huang SS, Heston WD, Autorino R, Wang X, Harsch KM, Magi-Galluzzi C, Isac W, Khanna R, Hu B, Escobar P, Chalikonda S, Rao PK, Haber GP, Kaouk JH, Stein RJ. *Urology.* febrero de 2013; 81 (2): 451-6; (g) Kelderhouse LE, Chelvam V, Wayua C, Mahalingam S, Poh S, Kularatne SA, Low PS. *Bioconjug Chem.* 19 de junio de 2013; 24 (6): 1075-80.] se han analizado como agentes de obtención de imágenes en modelos murinos de cáncer de próstata.

Aunque se demostró que estos colorantes del NIR dirigidos al PSMA marcaban algunas células de cáncer de próstata en cultivo, tenían una fluorescencia muy débil en modelos de animal de xenoinjerto de tumor prostático que expresa el PSMA. Por ejemplo, las moléculas descritas por Humblet et al han mostrado una baja acumulación en el tumor y fluorescencia en modelos de xenoinjerto de tumor. Esto puede ser debido a que la ausencia de un separador apropiado entre el ligando y el colorante del NIR puede haber obstaculizado la unión del ligando a la cavidad de unión del PSMA. Por otro lado, los ligandos basados en fósforo tienen menos afinidad por el PSMA en comparación con el DUPA. Además, los ligandos basados en fósforo son difíciles de sintetizar, implican múltiples etapas y serán caros de elaborar.

El agente del NIR dirigido al PSMA notificado en Chen et al ha tardado más de 20 h en alcanzar el tumor y 72 h en eliminarse de los tejidos no objetivo. También de forma notable, este colorante del NIR dirigido al PSMA se elimina de la piel muy lentamente. Aunque la unión del epítipo del PSMA en las células transfectadas que usaron pueda ser artificial, tenía una captación muy baja y una baja fluorescencia en el tumor de células de cáncer de próstata transfectadas con el PSMA. Además, hay una sustancial captación no específica de esta molécula en todos los demás tejidos, y hay acumulación y fluorescencia en células negativas para el PSMA, lo que indica la naturaleza no específica y no dirigida del conjugado del NIR notificado por Chen *et al*.

Chen et al y Laydner et al también han conjugado un ligando de molécula pequeña con IR800CW (un colorante del NIR). El IR800CW es un colorante asimétrico con un ácido carboxílico activado con un éster de n-hidroxisuccinimida (NHS). Esta es una molécula extremadamente cara de sintetizar e incluso más de adquirir en los recursos disponibles comercialmente (1 g cuesta más de 60.000 \$). El IR800CW también tiene el inconveniente de que no es estable durante la síntesis debido a dos razones: (a) hidrólisis del éster de NHS, (b) hidrólisis del vinil éter. La ausencia de estabilidad de los conjugados de IR800CW durante la síntesis da lugar a la formación de más del 60 % de subproductos no deseados. Esto requiere complejas técnicas de purificación que indican el camino de un coste de producción mayor, un mayor periodo de espera para su traducción a la clínica, y unos cirujanos y pacientes que no tendrán acceso al fármaco.

Laydner et al conjugaron un ligando de PSMA al IR800CW a través de un largo espacio peptídico (6 aminoácidos) y un conector bifuncional con NHS y maleimida. Además de todos los inconvenientes causados por el IR800CW, este

conjugado de IR800CW dirigido al PSMA tiene un complicado esquema sintético que requiere la síntesis en cinco fases (síntesis del ligando, conjugación del ligando a un conector bifuncional a través de un grupo funcional maleimida, síntesis del conector peptídico, conjugación del conector peptídico con IR800CW, conjugación del conector peptídico-IR800CW con el conector del ligando bifuncional a través de un enlace amida) en múltiples etapas. Por lo tanto, los
 5 costes de fabricación impiden la producción eficaz de esta molécula con fines clínicos. El esquema sintético de estas moléculas es más complicado debido a los múltiples centros quirales de la molécula. Sin embargo, los separadores peptídicos poseen múltiples centros quirales (estereoisómeros) que normalmente tienen la necesidad de la producción y evaluación de todos los estereoisómeros para la aprobación por parte de la FDA. Por ejemplo, un separador peptídico que únicamente posee 3 aminoácidos (es decir, 3 centros quirales), necesitaría los perfiles de toxicidad de 8 productos
 10 farmacéuticos diferentes, dado que estas mezclas heterogéneas podrían dar como resultado diferentes afinidades, eficacias, farmacocinéticas y perfiles de seguridad.

El ligando de molécula pequeña usado por Laydner *et al.* es GluNHCONHCys-SH. El resto de tiol libre de la Cys tiende a oxidarse, y por tanto la molécula debe ser manipulada en un entorno de argón o de nitrógeno y, generalmente, da
 15 lugar a una molécula inestable. El ligando GluNHCONHCys-SH está conjugado con un conector bifuncional a través de una reacción de maleimida. Se sabe bien que las reacciones entre tioles y maleimida son reversibles, y el rendimiento es de un 50 % del producto deseado. Además, los enlaces de maleimida no son estables en la circulación del cuerpo humano, por lo que el uso de enlaces de maleimida presenta el riesgo de liberar el colorante no dirigido, dando lugar a una captación no específica del mismo.

Kelderhouse *et al.* conjugaron DUPA-conector-Cys con Alexa flúor 647 y Dilight 750 con DUPA a través de un grupo maleimida. De nuevo, estas moléculas tienen todos los inconvenientes asociados con la maleimida. Además, estos colorantes del NIR de longitud de onda corta, aunque están disponibles comercialmente, son muy caros. Aunque las moléculas se analizaron en un modelo murino metastásico experimental, las imágenes no eran concluyentes.
 20

Liu *et al.* también notificaron un colorante del NIR dirigido al PSMA y algunos datos *in vitro*, pero no se notificaron datos en animales. La ausencia de un separador apropiado entre el ligando y el colorante del NIR puede atribuirse a la ausencia de datos *in vivo*. Además, este colorante tiene muchos inconvenientes, al igual que otros compuestos notificados. Es un ligando basado en fósforo y colorante asimétrico. Por tanto, tiene los inconvenientes descritos tanto
 25 para los ligandos basados en fósforo como para los colorantes del NIR asimétricos.

Nakajima *et al.* notificaron un anticuerpo anti-PSMA (J591) conjugado con ICG. Desafortunadamente, este compuesto tardó 72 horas en ser eliminado de otros tejidos sanos tales como el hígado. Además, el compuesto permaneció en circulación durante 6 días, lo que indica que permanecerá en el cuerpo durante más de 30 días en el cuerpo humano.
 35 Además, El ICG estaba anclado al J591 no específicamente a través de amida usando cualquier resto de lisina de la proteína, dando lugar a entidades químicas heterogéneas que dan como resultado afinidades, eficacias, farmacocinéticas y perfiles de seguridad variables. La ausencia de una definición estructural precisa puede limitar la progresión de estos conjugados para el uso clínico debido a las dificultades asociadas con el proceso de producción y la seguridad.

La mayor inespecificidad y la lenta eliminación de la piel de los colorantes del NIR dirigidos al PSMA notificados puede ser debida a las malas propiedades farmacocinéticas (FC) de estos compuestos.
 40

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de una sustancia colorante que puede usarse para dirigirse específicamente a las células cancerosas que expresan el PSMA o a la neovasculatura del tejido enfermo con una mayor estabilidad, unas mejores propiedades FC, una mayor solubilidad, una acumulación rápida en el tumor, una elevada fluorescencia, una rápida eliminación de la piel y unas mayores relaciones entre el tumor y la señal de fondo (TBR) para su uso en la obtención de imágenes de tejidos *in vivo* y su uso en la cirugía guiada por imagen.
 45

El documento WO 2014/127365 divulga ligandos del PSMA, en particular compuestos denominados PSMA-1-IR800CW o PSMA-1-Cy5, que pueden usarse, por ejemplo, para la obtención de imágenes *in vivo* de células que expresan el PSMA.
 50

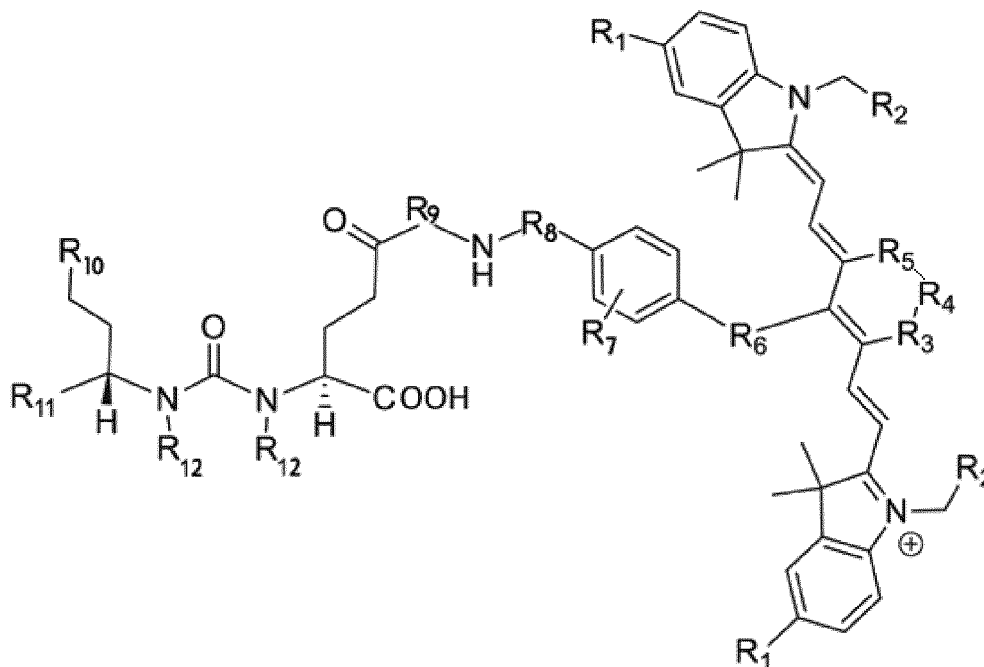
El documento WO 2010/108125 divulga compuestos que se dirigen al PSMA, que pueden usarse para la obtención de imágenes, en terapia, en la clasificación celular y el cartografiado tumoral.
 55

Breve resumen de la invención

Esta divulgación proporciona ligandos dirigidos al PSMA unidos a colorantes del NIR a través de diferentes conectores para mejorar las propiedades clínicas (por ejemplo, la estabilidad, las propiedades FC, la solubilidad, una acumulación rápida en el tumor, una mayor fluorescencia, una rápida eliminación de la piel y mayores relaciones entre el tumor y la señal de fondo) de los compuestos. La divulgación proporciona usos de los compuestos en cirugía guiada por imagen y métodos para sintetizarlos. Esta divulgación proporciona además una variación de la carga total del conjugado de ligando-conector-colorante del NIR mediante la adición de cargas positivas al conector o la reducción del número de cargas negativas en las moléculas del colorante. Esta divulgación también proporciona novedosos ligandos con mayor afinidad para mejorar la afinidad *in vivo* y las propiedades FC de los conjugados del NIR. Esta
 60
 65

divulgación también proporciona compuestos para su uso en la obtención dirigida de imágenes de tumores que expresan el PSMA, entre los que se incluye, pero sin limitarse a este, el cáncer de próstata, y en la cirugía de tejidos y tumores positivos para el PSMA.

5 La presente invención se refiere a un compuesto que tiene la fórmula estructural:

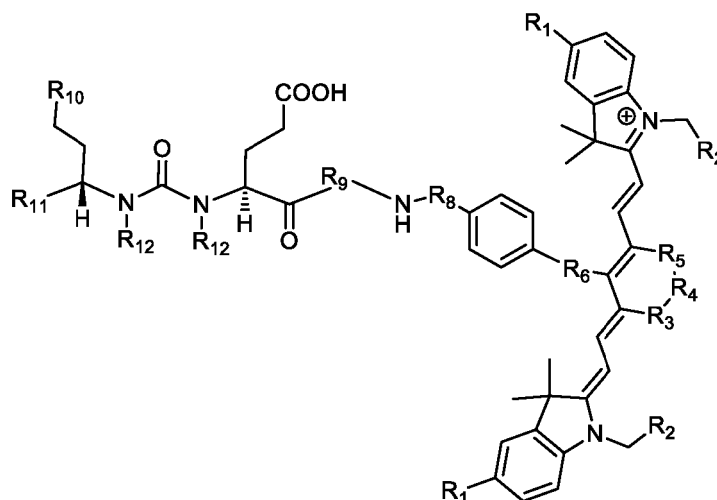


(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

- 10 R₁ representa un hidrógeno o SO₃H;
R₂ representa un hidrógeno, CH₃, C₃H₆SO₃⁻, C₃H₆SO₃H o C₄H₈SO₃⁻ o C₄H₈SO₃H o C₃H₆N⁺(CH₃)₃;
R₃, y R₅ representan cada uno un carbono, opcionalmente uno o más enlaces compartidos,
R₄ representa un carbono opcionalmente con uno o más enlaces compartidos;
R₆ representa nitrógeno, oxígeno o azufre o ningún átomo (enlace directo C-C entre el anillo aromático y el anillo de
15 vinilo);
R₇ es opcional y, cuando está presente, representa un grupo sustituyente aromático para mejorar las propiedades espectrales tales como un aumento de brillo y la estabilidad del puente de vinil éter;
R₈ es opcional y, cuando está presente, representa conectores con aminoácidos aromáticos tales como Phe, Trp, His, aminoácidos catiónicos como Arg, Lys, aminoácidos aniónicos tales como Asp, Glu, aminoácidos no naturales de
20 ácidos aromáticos/catiónicos/aniónicos; R₉ es opcional y, cuando está presente, representa una cadena carbonada lineal o un conector de polietilenglicol, conector catiónico;
R₁₀ representa un CO₂H, PO₃H₂, SO₃H, CH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂CH₂SO₃H;
R₁₁ representa CO₂H, SO₃H, CH₂CONHCH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂CH₂SO₃H; y
R₁₂ representa un hidrógeno, un grupo metilo, un CH₂ y cada uno puede representar, opcionalmente, un CH₂ que
25 comparte un enlace.

La presente invención también se refiere a un compuesto que tiene la fórmula estructural:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R₁ representa un hidrógeno o SO₃H;

5 R₂ representa un hidrógeno o CH₃ o C₃H₆SO₃⁻ o C₃H₆SO₃H o C₄H₈SO₃⁻ o C₄H₈SO₃H o C₃H₆N⁺(CH₃)₃;
R₃, y R₅ representan cada uno un carbono, opcionalmente uno o más enlaces compartidos, u oxígeno o azufre, o nitrógeno

R₄ representa un carbono opcionalmente con uno o más enlaces compartidos;

10 R₆ representa nitrógeno, oxígeno o azufre o ningún átomo (enlace directo C-C entre el anillo aromático y el anillo de vinilo);

R₇ es opcional y, cuando está presente, representa un grupo sustituyente aromático donante de electrones;

R₈ es opcional y, cuando está presente, representa conectores con aminoácidos aromáticos tales como Phe, Trp, His, Tyr, y/o aminoácidos catiónicos como Arg, Lys, y/o aminoácidos aniónicos tales como Asp, Glu, y/o aminoácidos no naturales de ácidos aromáticos/catiónicos/aniónicos;

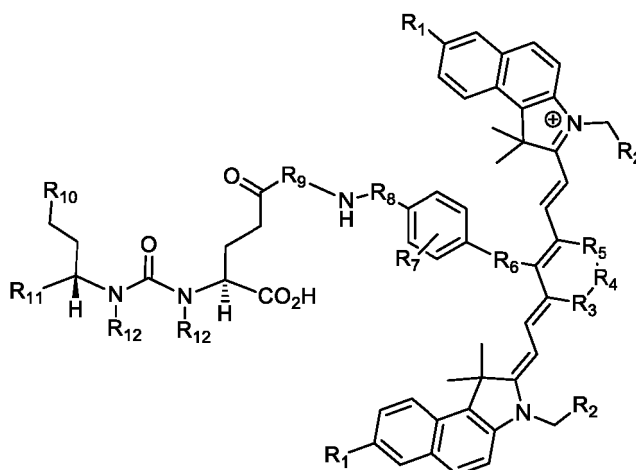
15 R₉ es opcional y, cuando está presente, representa una cadena carbonada lineal, o conectores de polietilenglicol, conectores de polietilenamina o un conector catiónico;

R₁₀ representa un CO₂H, PO₃H₂, SO₃H, CH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂CH₂SO₃H;

R₁₁ representa CO₂H, SO₃H, CH₂CONHCH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂CH₂SO₃H; y

20 R₁₂ representa independientemente representa un hidrógeno, un grupo metilo, CH₂COOH, un CH₂ y cada uno puede representar, opcionalmente, un CH₂ que comparte un enlace.

La presente invención también se refiere a un compuesto que tiene la fórmula estructural:



25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:
R₁ representa un hidrógeno o SO₃H;

R₂ representa un hidrógeno o CH₃ o C₃H₆SO₃⁻ o C₃H₆SO₃H o C₄H₈SO₃⁻ o C₄H₈SO₃H o C₃H₆N⁺(CH₃)₃;

30 R₃, y R₅ representan cada uno un carbono, opcionalmente uno o más enlaces compartidos, u oxígeno o azufre, o nitrógeno

R₄ representa un carbono opcionalmente con uno o más enlaces compartidos;

R₆ representa nitrógeno, oxígeno o azufre o ningún átomo (enlace directo C-C entre el anillo aromático y el anillo de vinilo);

R₇ es opcional y, cuando está presente, representa un grupo sustituyente aromático donante de electrones;
 R₈ es opcional y, cuando está presente, representa conectores con aminoácidos aromáticos tales como Phe, Trp, His o Tyr, y/o aminoácidos catiónicos como Arg, Lys, y/o aminoácidos aniónicos tales como Asp, Glu, y/o aminoácidos no naturales de ácidos aromáticos/catiónicos/aniónicos;

- 5 R₉ es opcional y, cuando está presente, representa una cadena carbonada lineal, o conectores de polietilenglicol, conectores de polietilenamina o un conector catiónico;
 R₁₀ representa un CO₂H, PO₃H₂, SO₃H, CH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂CH₂SO₃H;
 R₁₁ representa CO₂H, SO₃H, CH₂CONHCH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂CH₂SO₃H; y
 R₁₂ representa independientemente representa un hidrógeno, un grupo metilo, CH₂COOH, un CH₂ y cada uno puede
 10 representar, opcionalmente, un CH₂ que comparte un enlace.

En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención tienen un máximo de absorción y de emisión entre aproximadamente 500 nm y aproximadamente 900 nm. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención tienen un máximo de absorción y de emisión entre aproximadamente 600 nm y 800 nm.

- 15 En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención están hechos para emitir fluorescencia después de la distribución de los mismos en las células tisulares. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención están hechos para emitir fluorescencia sometiendo a los compuestos a una luz de excitación en la longitud de onda del infrarrojo cercano. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención tienen una afinidad de unión al PSMA que es similar a la afinidad de unión del DUPA. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención son muy selectivos para dirigirse a una célula tumoral. En realizaciones particularmente preferidas, los compuestos de la presente invención se dirigen a células de cáncer de próstata. Dichos compuestos mencionados anteriormente pueden usarse para la obtención óptica de imágenes de tejido biológico que expresa el PSMA.

- 25 Dichos compuestos mencionados anteriormente pueden usarse para el tratamiento del cáncer. El cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de riñón, sarcoma, cáncer de mama, cáncer cerebral, carcinoma neuroendocrino, cáncer de colon, cáncer testicular o melanoma. Los compuestos de colorante del NIR dirigidos al PSMA de la presente invención pueden usarse para la obtención de imágenes de células que expresan el PSMA. Estas células pueden elegirse del grupo que consiste en células de próstata, células de cáncer de próstata, células de cáncer de vejiga, células de cáncer de páncreas, células de cáncer de hígado, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de riñón, células de sarcoma, células de cáncer de mama, células de cáncer cerebral, células de carcinoma neuroendocrino, células de cáncer de colon, células de cáncer testicular o células de melanoma.
 30 Dichos compuestos anteriores pueden usarse para el direccionamiento a un tipo celular en una muestra biológica. Dichos compuestos anteriores pueden usarse para realizar una cirugía guiada por imagen. Dichos compuestos anteriores pueden usarse en el diagnóstico de una enfermedad en un sujeto. La presente invención también se refiere a una composición que comprende al menos uno de dichos compuestos mencionados anteriormente y un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, y a un kit que comprende al menos uno de dichos compuestos mencionados anteriormente.

Breve descripción de los dibujos

- 45 Figura 1 - Los dibujos químicos (1) - (9) muestran las estructuras de los agentes de obtención de imágenes DUPA-conector-NIR dirigidos al PSMA con conectores de longitud variable.

Figura 2(A) - Estructura del conjugado de DUPA-FITC dirigido al PSMA (isotiocianato de fluoresceína) (14).

- 50 Figura 2(B) - Conjugado DUPA-FITC (isotiocianato de fluoresceína) (14) dirigido al PSMA y su afinidad de unión (K_D) y especificidad sobre células de cáncer de próstata humano 22Rv1 positivas para el PSMA y sobre células de epitelio basal alveolar humano A549 negativas para el PSMA en cultivo. Se añadió DUPA-FITC disuelto en medio RPMI en las concentraciones indicadas a las células 22Rv1 o A549 en medio de cultivo RPMI y se dejaron en incubación durante 1 h a 37 °C. Después se retiró el medio, se lavó con medio reciente (3x) y se substituyó por PBS (solución salina tamponada con fosfato). Las muestras se analizaron usando citometría de flujo. Las barras de error representan la DE (n = 3). s están contenidas en el sitio de reconocimiento del antígeno.

- 60 Figura 3 - Afinidades de unión relativas de los conjugados de DUPA-NIR 1-9 con respecto a DUPA-FITC (14). Se incubaron células de cáncer de próstata humano 22Rv1 positivas para el PSMA durante 1 h a 37 °C en presencia de DUPA-FITC 100 nM con concentraciones crecientes de los conjugados de DUPA-NIR. Después se retiró el medio, se lavó con medio reciente (3x) y se substituyó por PBS. La fluorescencia unida a la célula se analizó usando citometría de flujo.

- 65 Figura 5 - Relación entre la fluorescencia del tumor y del tejido a partir de los datos de biodistribución tisular de los conjugados de DUPA-NIR dirigidos al PSMA 1-9. Tras la obtención de las imágenes, se midió la fluorescencia en una región de interés (ROI) en cada tejido usando un programa informático de obtención de imágenes *in vivo* y después se calculó la fluorescencia entre el tumor y el tejido.

Figura 6 - Estructuras de los agentes de obtención de imágenes DUPA-conector-NIR dirigidos al PSMA con conectores aminoacídicos aromáticos entre el ligando y el colorante del NIR

5 Figura 7 - Afinidades de unión relativas de los conjugados de DUPA-NIR con conectores aminoacídicos aromáticos con respecto a DUPA-FITC (14). Se incubaron células de cáncer de próstata humano 22Rv1 positivas para el PSMA durante 1 h a 37 °C en presencia de DUPA-FITC 100 nM con concentraciones crecientes de los conjugados de DUPA-NIR. Después se retiró el medio, se lavó con medio reciente (3x) y se sustituyó por PBS. La fluorescencia unida a la célula se analizó usando citometría de flujo.

10 Figura 8 - Análisis de biodistribución tisular y relación entre el tumor y el tejido de los conjugados de DUPA-NIR **15 y 23** usando la obtención de imágenes de fluorescencia de ratones portadores de xenoinjertos de tumor de próstata humano (células 22Rv1). A ratones atímicos macho con xenoinjertos de tumor 22Rv1 se les inyectaron conjugados de DUPA-colorante del NIR a través de la vena de la cola. Los ratones se sacrificaron 2 h después de la administración del conjugado de DUPA-colorante del NIR, se recogieron los tejidos seleccionados y se obtuvieron imágenes de los tejidos con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s). Tras la obtención de las imágenes, se midió la fluorescencia en una región de interés (ROI) en cada tejido usando un programa informático de obtención de imágenes *in vivo* y después se calculó la fluorescencia entre el tumor y el tejido.

15 Figura 9 - Superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 20 nmol de **14** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

20 Figura 10 - Superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 20 nmol de **23** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

25 Figura 11 - Superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 20 nmol de **25** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

30 Figura 12 - Superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 6 nmol de **35** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

35 Figura 13 - Superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 6 nmol de **36** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

40 Figura 14 - Estructuras de los agentes de obtención de imágenes DUPA-conector-NIR dirigidos al PSMA con conectores de carga positiva entre el ligando y el colorante del NIR

45 Figura 15 - Afinidades de unión relativas de los conjugados de DUPA-NIR con respecto a DUPA-FITC (14). Se incubaron células de cáncer de próstata humano 22Rv1 positivas para el PSMA durante 1 h a 37 °C en presencia de DUPA-FITC 100 nM con concentraciones crecientes de los conjugados de DUPA-NIR. Después se retiró el medio, se lavó con medio reciente (3x) y se sustituyó por PBS. La fluorescencia unida a la célula se analizó usando citometría de flujo.

50 Figura 16 - Relación entre el tumor y el tejido de los conjugados de DUPA-NIR **39 y 41** usando la obtención de imágenes de fluorescencia de ratones portadores de xenoinjertos de tumor de próstata humano (células 22Rv1). A ratones atímicos macho con xenoinjertos de tumor 22Rv1 se les inyectaron conjugados de DUPA-colorante del NIR a través de la vena de la cola. Los ratones se sacrificaron 2 h después de la administración del conjugado de DUPA-colorante del NIR, se recogieron los tejidos seleccionados y se obtuvieron imágenes de los tejidos con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s). Tras la obtención de las imágenes, se midió la fluorescencia en una región de interés (ROI) en cada tejido usando un programa informático de obtención de imágenes *in vivo* y después se calculó la fluorescencia entre el tumor y el tejido.

55 Figura 17 - Superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 20 nmol de **39** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

- 5 Figura 18 - Superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 20 nmol de **40** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.
- 10 Figura 19 - Superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 20 nmol de **41** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.
- 15 Figura 20 - Estructuras de los agentes de obtención de imágenes DUPA-conector-NIR dirigidos al PSMA con conectores de carga negativa entre el ligando y el colorante del NIR
- 20 Figura 21 - Afinidades de unión relativas de los conjugados de DUPA-NIR de **49** y **50** con respecto a DUPA-FITC (14). Se incubaron células de cáncer de próstata humano 22Rv1 positivas para el PSMA durante 1 h a 37 °C en presencia de DUPA-FITC 100 nM con concentraciones crecientes de los conjugados de DUPA-NIR. Después se retiró el medio, se lavó con medio reciente (3x) y se sustituyó por PBS. La fluorescencia unida a la célula se analizó usando citometría de flujo.
- 25 Figura 22 - Análisis de biodistribución tisular y relación entre el tumor y el tejido de los conjugados de DUPA-NIR **49** y **50** usando la obtención de imágenes de fluorescencia de ratones portadores de xenoinjertos de tumor de próstata humano (células 22Rv1). A ratones atómicos macho con xenoinjertos de tumor 22Rv1 se les inyectaron conjugados de DUPA-colorante del NIR a través de la vena de la cola. Los ratones se sacrificaron 2 h después de la administración del conjugado de DUPA-colorante del NIR, se recogieron los tejidos seleccionados y se obtuvieron imágenes de los tejidos con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s). Tras la obtención de las imágenes, se midió la fluorescencia en una región de interés (ROI) en cada tejido usando un programa informático de obtención de imágenes *in vivo* y después se calculó la fluorescencia entre el tumor y el tejido.
- 30 Figura 23 - Estructuras de los agentes de obtención de imágenes DUPA-conector-NIR dirigidos al PSMA con una molécula de colorante del NIR con carga variable
- 35 Figura 24 - Afinidades de unión relativas de los conjugados de DUPA-NIR con respecto a DUPA-FITC (14). Se incubaron células de cáncer de próstata humano 22Rv1 positivas para el PSMA durante 1 h a 37 °C en presencia de DUPA-FITC 100 nM con concentraciones crecientes de los conjugados de DUPA-NIR. Después se retiró el medio, se lavó con medio reciente (3x) y se sustituyó por PBS. La fluorescencia unida a la célula se analizó usando citometría de flujo.
- 40 Figura 25 - Superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 20 nmol de **54** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.
- 45 Figura 26 - Superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 20 nmol de **55** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.
- 50 Figura 27 - Superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 20 nmol de **56** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.
- 55 Figura 28 - Superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 20 nmol de **57** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.
- 60 Figura 29 - Superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 20 nmol de **58** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.
- 65 Figura 30 - Superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 20 nmol de **60** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. =

ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

Figura 31 - Estructuras de los agentes de obtención de imágenes DUPA-conector-NIR dirigidos al PSMA con diversos conectores y colorantes del NIR

5 Figura 32 - Afinidades de unión relativas de los conjugados de DUPA-NIR con respecto a DUPA-FITC (14). Se incubaron células de cáncer de próstata humano 22Rv1 positivas para el PSMA durante 1 h a 37 °C en presencia de DUPA-FITC 100 nM con concentraciones crecientes de los conjugados de DUPA-NIR. Después se retiró el medio, se lavó con medio reciente (3x) y se sustituyó por PBS. La fluorescencia unida a la célula se analizó usando citometría de flujo.

10 Figura 33 - Superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 20 nmol de **63** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

15 Figura 34 - Superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 6 nmol de **63** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

20 Figura 35 - Superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 20 nmol de **64** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

Figura 36 - Estructuras de los agentes de obtención de imágenes del NIR dirigidos al PSMA con diferentes ligandos

30 **Figura 37:** Afinidades de unión relativas de los conjugados del NIR dirigidos al PSMA con respecto a DUPA-FITC (14). Se incubaron células de cáncer de próstata humano 22Rv1 positivas para el PSMA durante 1 h a 37 °C en presencia de DUPA-FITC 100 nM con concentraciones crecientes de los conjugados de DUPA-NIR. Después se retiró el medio, se lavó con medio reciente (3x) y se sustituyó por PBS. La fluorescencia unida a la célula se analizó usando citometría de flujo.

35 **Figura 38:** Superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 6 nmol de **14** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

40 **Definiciones**

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque puede usarse cualquier método, dispositivo y material similar o equivalente a los descritos en este documento en la práctica o el ensayo de la invención, a continuación se describen los métodos, dispositivos y materiales preferidos.

50 Con respecto a los conjugados del NIR dirigidos al PSMA de la presente invención, la expresión "antigénicamente específico" o "que se une específicamente" se refiere a compuestos que se dirigen al PSMA que se unen a uno o más epítomos del PSMA, pero que sustancialmente no reconocen ni se unen a otras moléculas de una muestra que contenga una población mixta de antígenos.

La expresión "epítomo" como se usa en el presente documento se refiere a un sitio del PSMA que es reconocido por el DUPA. Un epítomo puede ser una secuencia lineal o formada conformacionalmente o con forma de aminoácidos.

60 Como se usa en el presente documento, "compuesto que se dirige al PSMA" o "compuesto dirigido al PSMA" debe incluir aquellas moléculas pequeñas, ligandos, polipéptidos y proteínas que tienen al menos la actividad biológica de unión específica al PSMA o a un epítomo del PSMA. Estos compuestos incluyen ligandos, receptores, péptidos o cualquier secuencia de aminoácidos que se una al PSMA o al menos a un epítomo del PSMA.

Los compuestos de la presente invención comprenden un compuesto que se dirige al PSMA, pueden unirse a una porción del propio PSMA o pueden unirse a una proteína o receptor de la superficie de la célula que esté asociado con el PSMA.

65 Las expresiones "grupo funcional", "resto activo", "grupo activador", "grupo saliente", "sitio reactivo", "grupo químicamente reactivo" y "resto químicamente reactivo" se usan en la técnica y en el presente documento para

referirse a distintas porciones o unidades definibles de una molécula. Las expresiones son en cierto modo sinónimas en las artes químicas, y en el presente documento se usan para indicar las porciones de las moléculas que realizan alguna función o actividad y que son reactivas con otras moléculas.

5 El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y no naturales, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que actúan de manera similar a la de los aminoácidos naturales. Los aminoácidos codificados de forma natural son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina) y pirolisina y selenocisteína. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen
10 la misma estructura química básica que la de un aminoácido natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, tales como, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio de metionina. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural.

15 Los aminoácidos pueden mencionarse en el presente documento bien por sus símbolos habitualmente conocidos de tres letras o bien mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB.

20 La presente invención aborda, entre otras cosas, los problemas asociados con el diagnóstico y el tratamiento quirúrgico temprano de células que expresan el PSMA implicadas en una enfermedad y/o un cáncer y, en particular, conjugados de colorante dirigidos al PSMA, obteniéndose mejoras en la obtención de imágenes, el diagnóstico y las propiedades biológicas que incluyen, como ejemplos no limitantes, una mayor especificidad, una menor señal de fondo y una mayor fluorescencia del tumor.

25 Descripción detallada

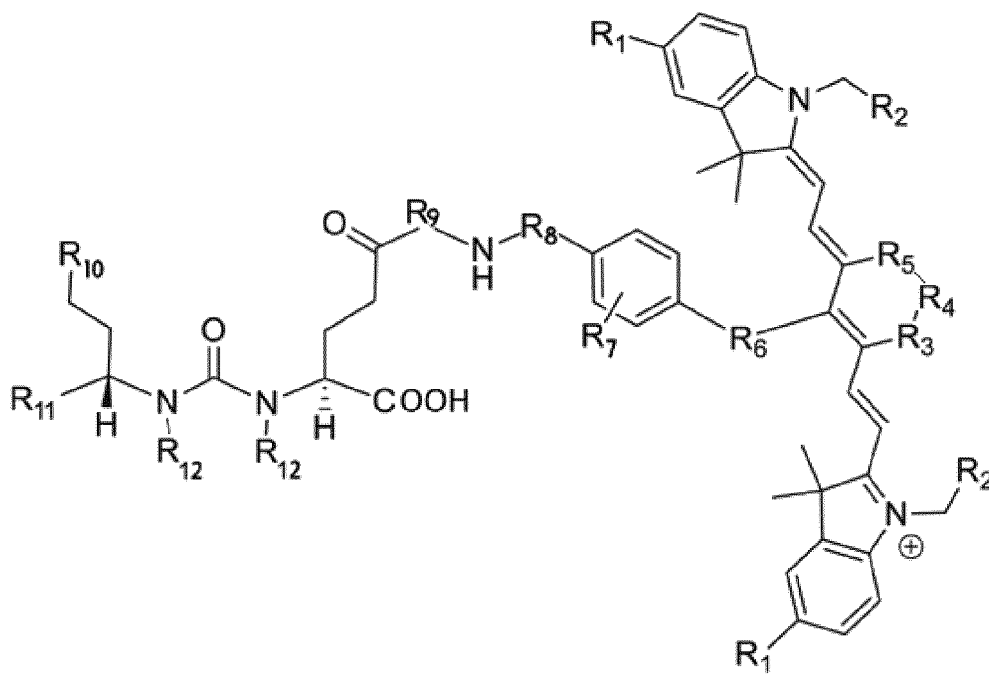
La cirugía cura al 50 % de los pacientes con tumores sólidos en los Estados Unidos, mientras que la quimio- y la radioterapia curan menos del 5 % de todos los pacientes oncológicos. Más de 700.000 pacientes pueden pasar por una cirugía oncológica cada año en los Estados Unidos, y el 40 % de los pacientes quirúrgicos tienen recidivas de una enfermedad locorregional en 5 años. A pesar de los importantes avances en el campo de la oncología, sigue existiendo la necesidad de métodos de detección temprana para superar los obstáculos en la resección quirúrgica completa del tumor primario con márgenes negativos y la eliminación de células cancerosas metastásicas y la identificación de la enfermedad satélite. Al conseguir estos tres objetivos no solo se mejora la eliminación de la enfermedad, sino que también se guían las decisiones relativas a la quimioterapia y la radiación postoperatorias. Aunque se ha mostrado que los colorantes fluorescentes no dirigidos se acumulan de manera pasiva en algunos tumores, las relaciones resultantes entre el tumor y la señal de fondo a menudo son bajas y los límites entre los tejidos cancerosos y los sanos pueden ser difíciles de definir. Aunque se han usado colorantes de fluorescencia dirigidos a ligandos (por ejemplo, EC17: folato-EDA-FITC) para la obtención de imágenes de un tejido, estos colorantes no han sido eficaces ya que no penetran en el tejido profundo y, por lo tanto, solo identificaron las células específicas de la superficie de un tejido en lugar de más profundamente en la muestra tisular. Además, los colorantes basados en fluoresceína tienen los inconvenientes de una baja estabilidad durante el periodo de validez. El puente de tiourea formado por los compuestos de Isotiociano (FITC) fluorescentes se descompone con facilidad, dando lugar a un compuesto inestable. Además, el EC17 usa fluoresceína, que tiene el inconveniente de un nivel relativamente alto de ruido de fondo no específico debido al colágeno de los tejidos que rodean al sitio de obtención de imágenes. Además, la absorción de luz visible por parte de cromóforos biológicos, en particular, hemoglobina, limita adicionalmente la utilidad de los colorantes que incorporan fluoresceína. Por lo tanto, los colorantes convencionales no pueden detectar fácilmente tumores que estén ubicados más profundamente de unos pocos milímetros en el tejido. Además, la fluorescencia de la fluoresceína se inactiva a un pH bajo (por debajo de pH 5).

50 Para que un material colorante sea útil en la detección y la cirugía guiada o para proporcionar la detección de la obtención de imágenes de tejido temprano, metastásico y otros tejidos, es importante que supere estos inconvenientes. La presente invención proporciona conjugados de colorantes del infrarrojo cercano dirigidos al PSMA que son estables, que emiten fluorescencia en el intervalo infrarrojo, que penetran profundamente en el tejido al que se dirigen para producir una identificación específica y brillante de las áreas de tejido que expresan el PSMA, que se eliminan rápidamente de los tejidos que no expresan el PSMA para obtener una elevada relación entre el tumor y la señal de fondo, y que se eliminan rápidamente de la piel. Más específicamente, los conjugados dirigidos al PSMA están unidos a colorantes del infrarrojo cercano a través de un conector que consiste en uno o más separadores atómicos que son aminoácidos. Incluso más específicamente, se ha averiguado que cuando el separador atómico es un separador hidrófobo de 7 átomos con átomos neutros o cargados y el separador aminoácido es un aminoácido aromático o un aminoácido con carga negativa o positiva y tirosina, la carga del conector puede variarse para obtener una rápida eliminación de la piel y una rápida acumulación en el tumor para obtener una mayor relación entre el tumor y la señal de fondo. Además, la intensidad de fluorescencia del colorante del NIR se mantiene o incluso se mejora al tener el aminoácido aromático o la tirosina, y la carga del colorante del NIR puede variarse para conseguir una rápida
65 eliminación de la piel.

Esta divulgación proporciona ligandos dirigidos al PSMA unidos a colorantes del NIR y métodos para sintetizarlos. Esta divulgación también proporciona compuestos para su uso en la obtención dirigida de imágenes de tumores que expresan el PSMA, que incluyen, pero no se limitan a, cáncer de próstata, y para su uso, por ejemplo, en la obtención de imágenes y en la cirugía que implica tejidos y tumores positivos para el PSMA.

5

La presente invención se refiere a un compuesto que tiene la fórmula estructural:

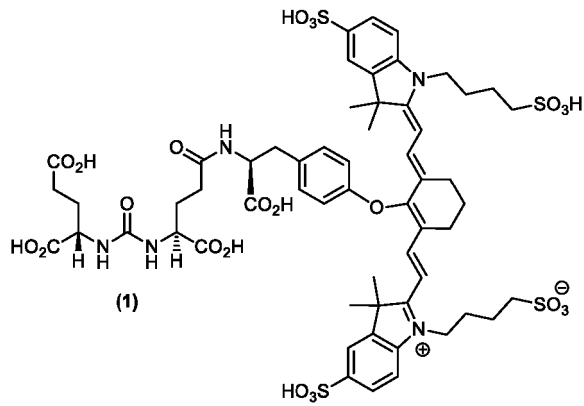


(I)

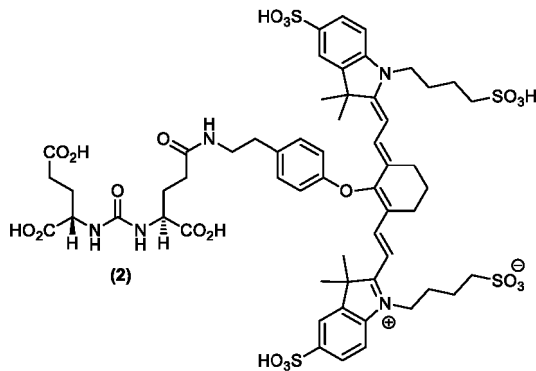
- 10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:
 R_1 representa un hidrógeno o SO_3H ;
 R_2 representa un hidrógeno, CH_3 , $\text{C}_3\text{H}_6\text{SO}_3^-$, $\text{C}_3\text{H}_6\text{SO}_3\text{H}$ o $\text{C}_4\text{H}_8\text{SO}_3^-$ o $\text{C}_4\text{H}_8\text{SO}_3\text{H}$ o $\text{C}_3\text{H}_6\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$;
 R_3 , y R_5 representan cada uno un carbono, opcionalmente uno o más enlaces compartidos, u oxígeno o azufre, o nitrógeno
15 R_4 representa un carbono opcionalmente con uno o más enlaces compartidos;
 R_6 representa nitrógeno, oxígeno o azufre o ningún átomo (enlace directo C-C entre el anillo aromático y el anillo de vinilo);
 R_7 es opcional y, cuando está presente, representa un grupo sustituyente aromático donante de electrones;
 R_8 es opcional y, cuando está presente, representa conectores con aminoácidos aromáticos tales como Phe, trp, His,
20 y/o aminoácidos catiónicos como Arg, Lys., y/o aminoácidos aniónicos tales como Asp, Glu, y/o aminoácidos no naturales de ácidos aromáticos/catiónicos/aniónicos;
 R_9 es opcional y, cuando está presente, representa una cadena carbonada lineal o un conector de polietilenglicol, conectores de polietilenamina, conector catiónico;
 R_{10} representa un CO_2H , PO_3H_2 , SO_3H , $\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$;
25 R_{11} representa CO_2H , SO_3H , $\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $\text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$; y
 R_{12} representa un hidrógeno, un grupo metilo, un CH_2 y cada uno puede representar, opcionalmente, un CH_2 que comparte un enlace.

30

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

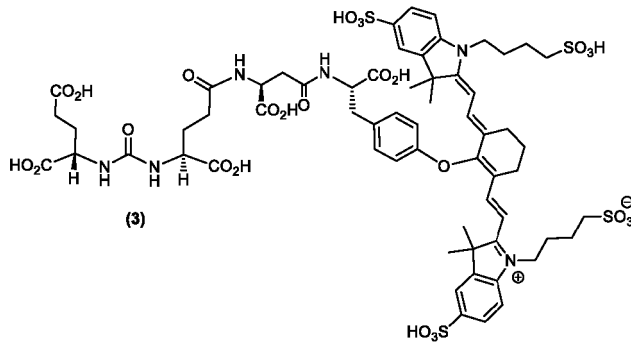


En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



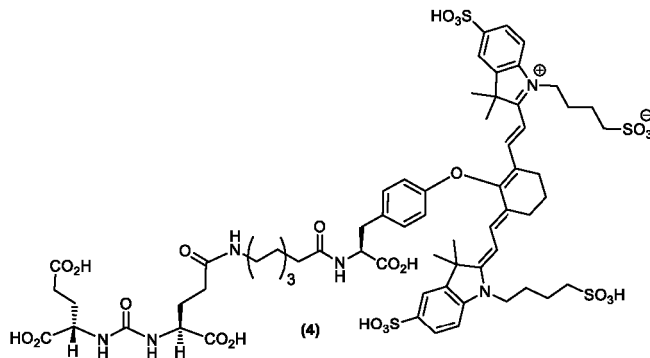
5

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

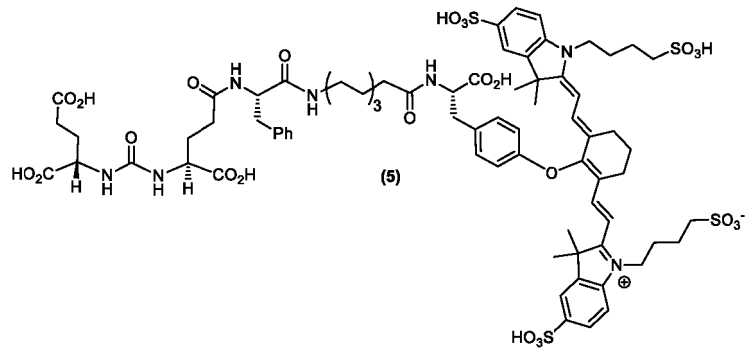


10

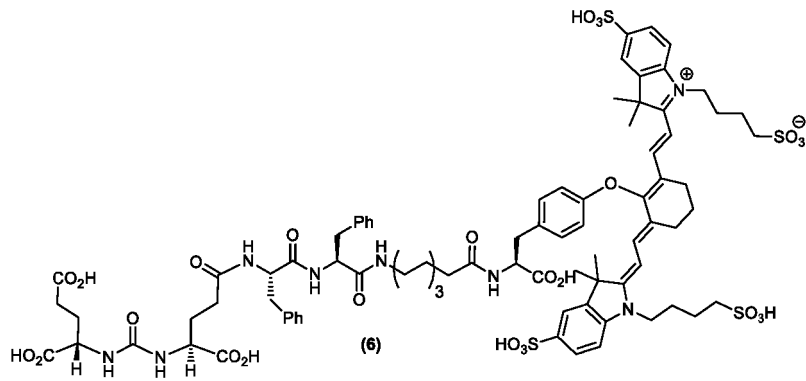
En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



15 En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

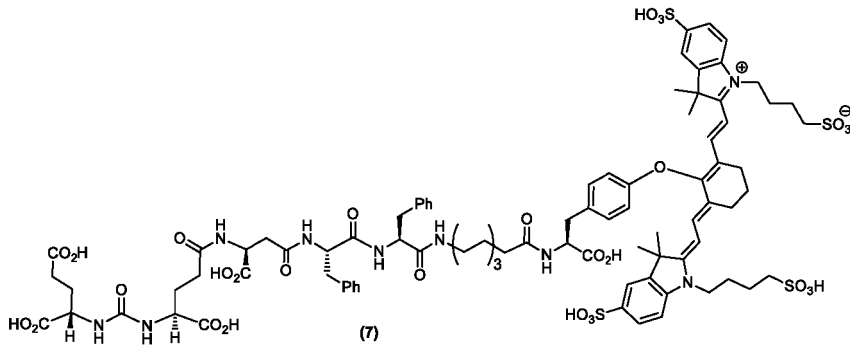


En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



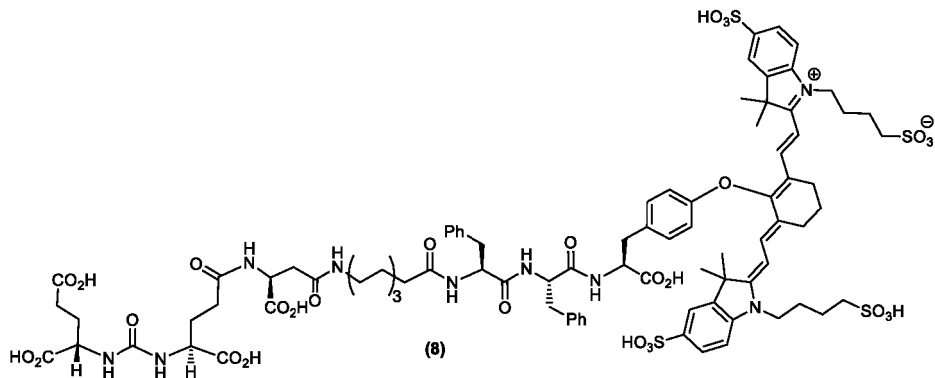
5

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

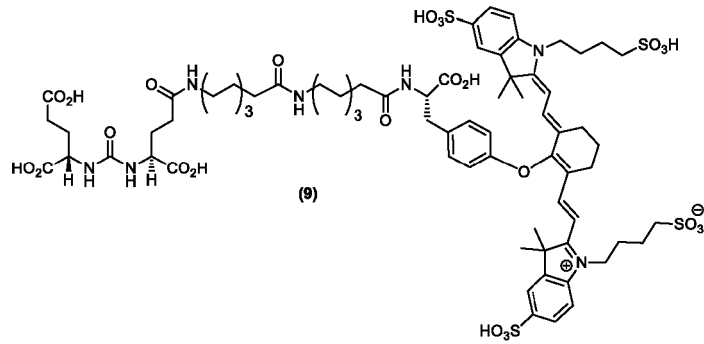


10

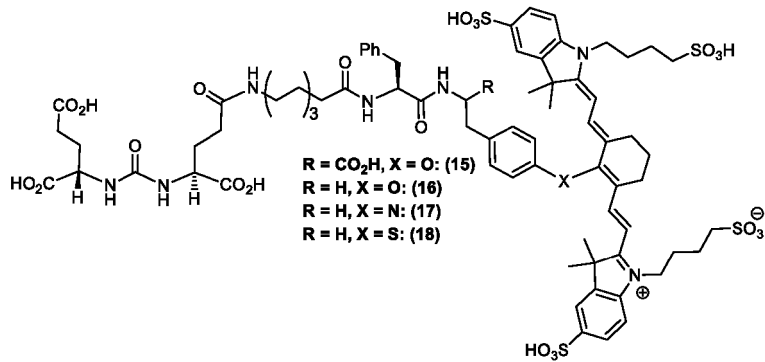
En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



15 En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

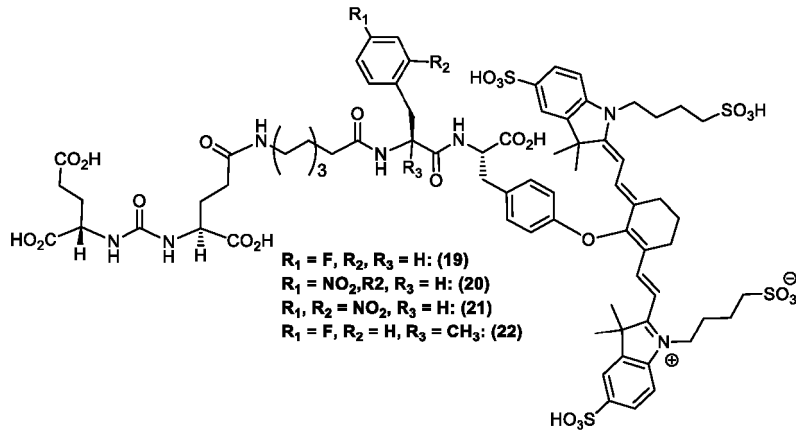


En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



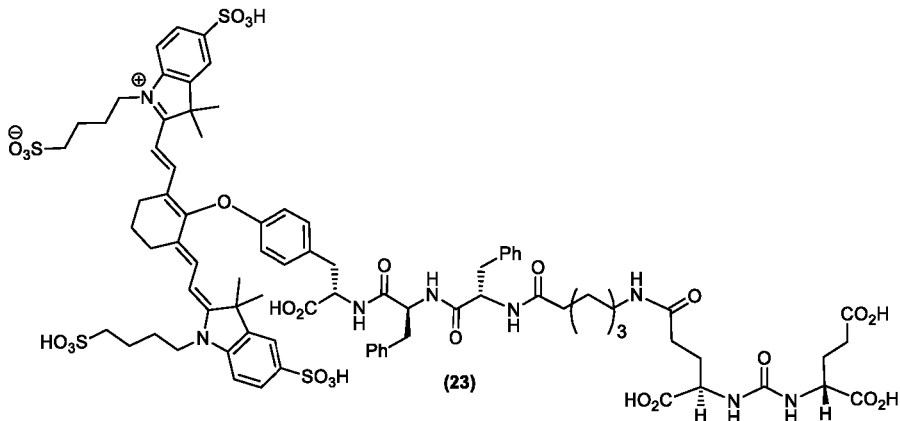
5

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

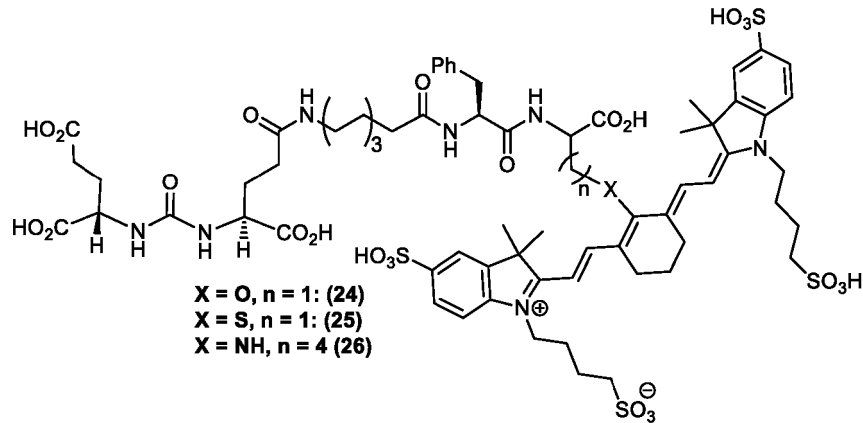


10

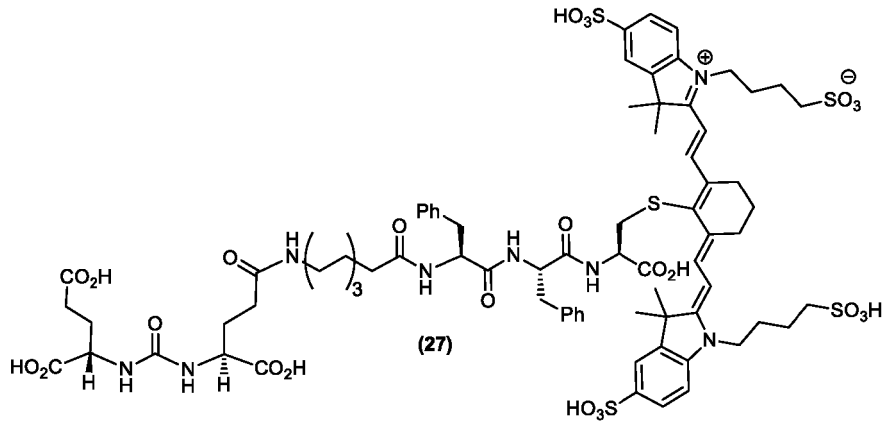
En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

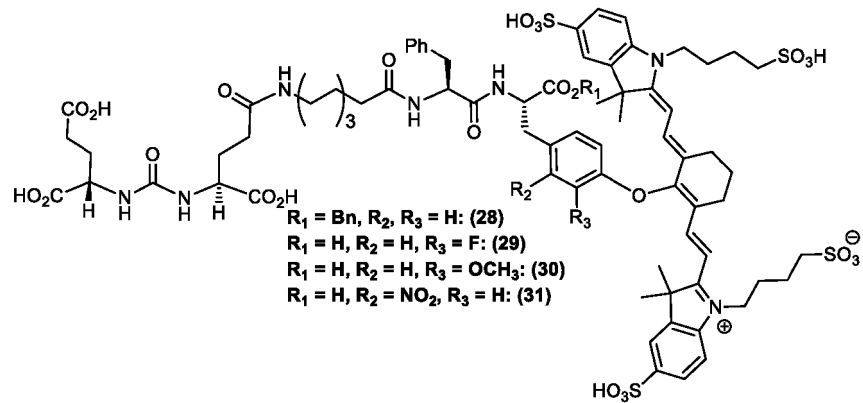


5 En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

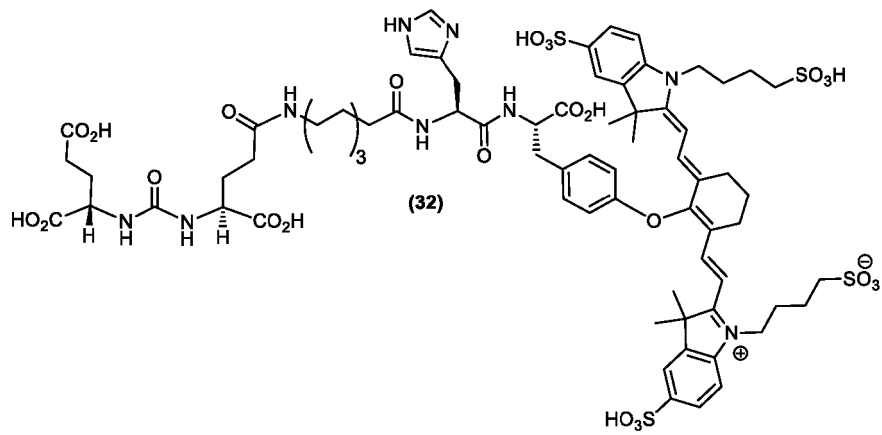


En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

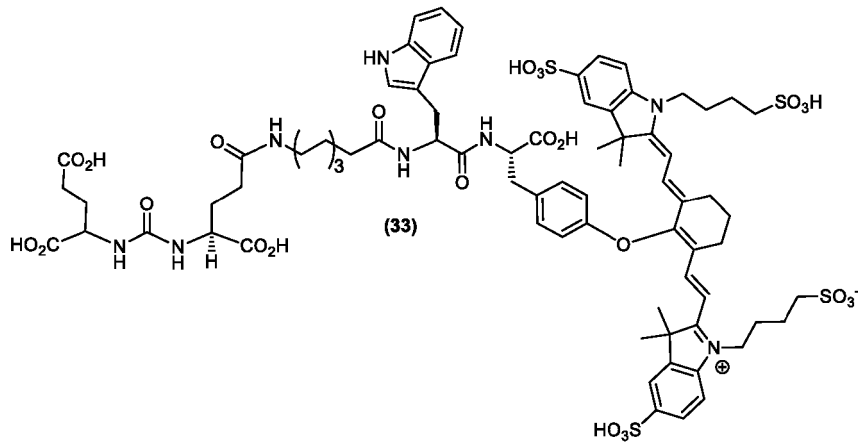
10



En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

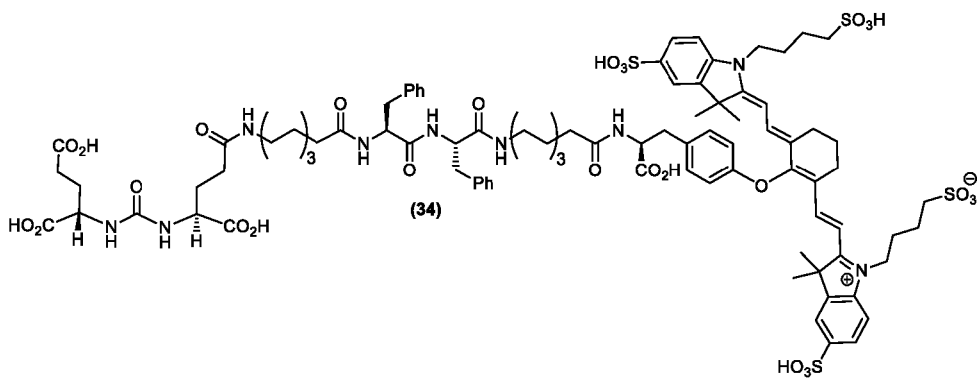


En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



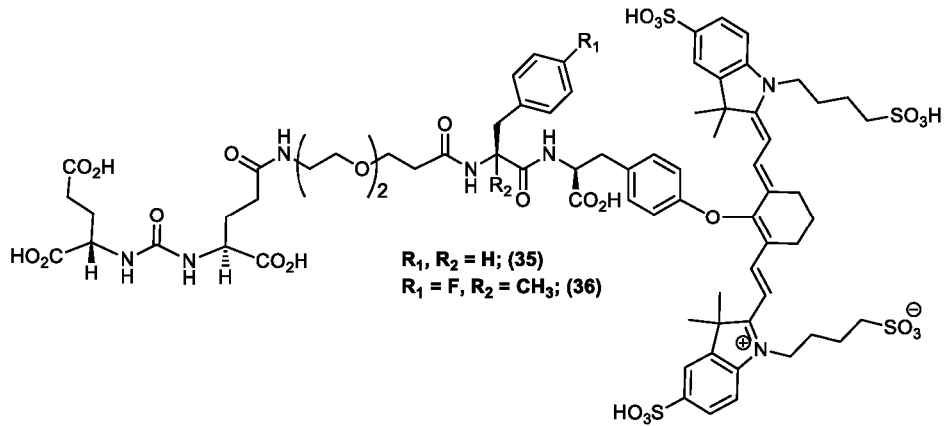
5

En algunas realizaciones, la presente invención un compuesto que tiene la fórmula estructural:

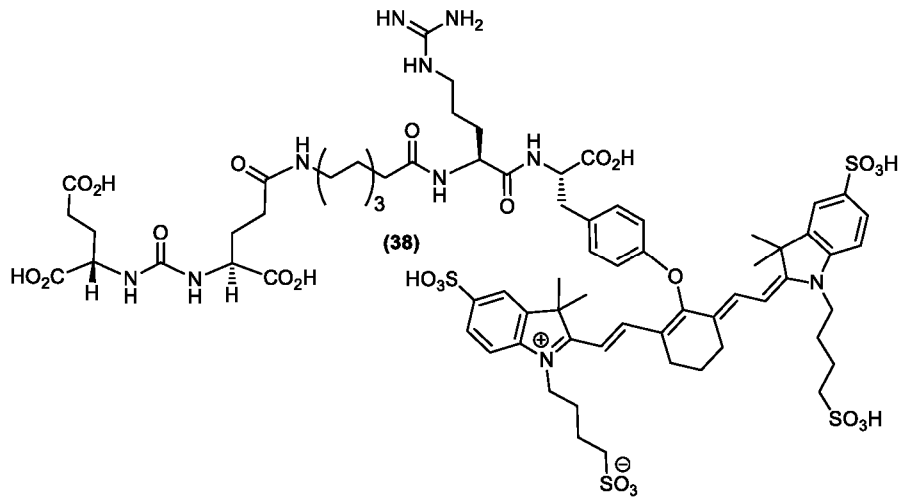


10

En algunas realizaciones, la presente invención un compuesto que tiene la fórmula estructural:

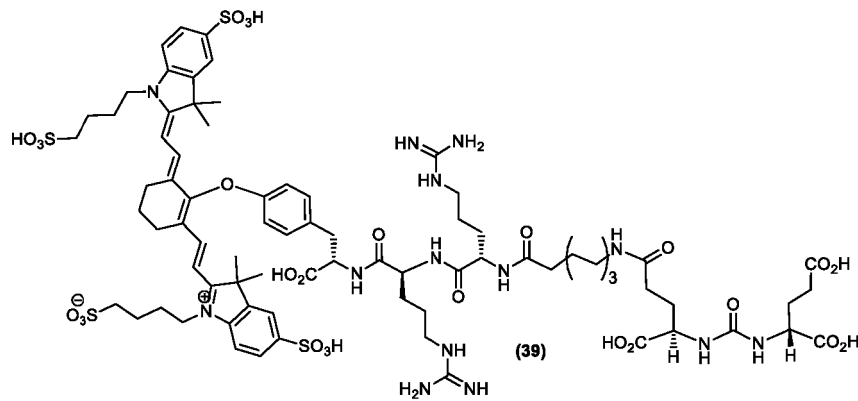


En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



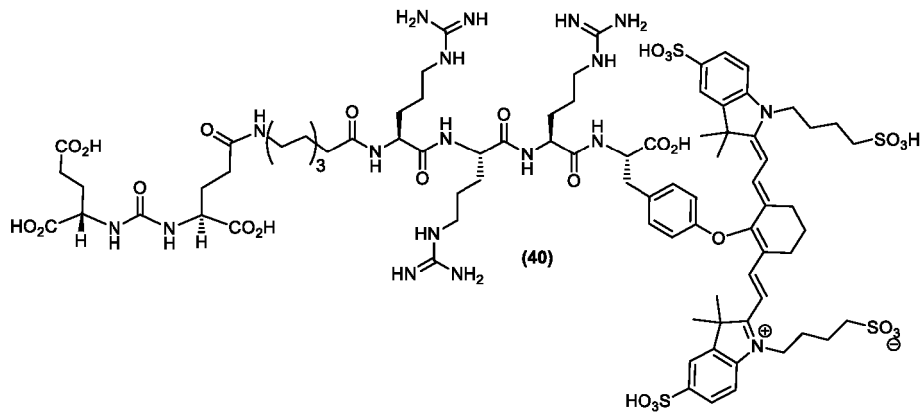
5

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

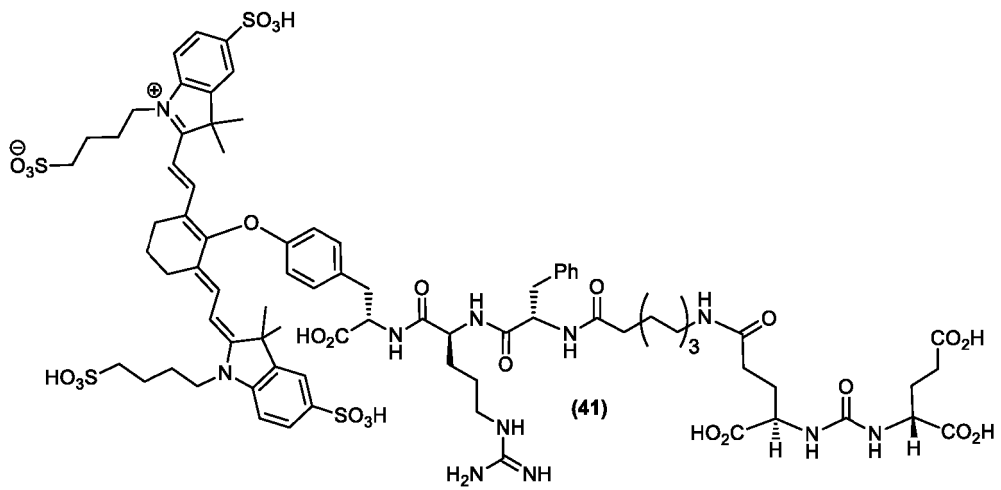


10

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

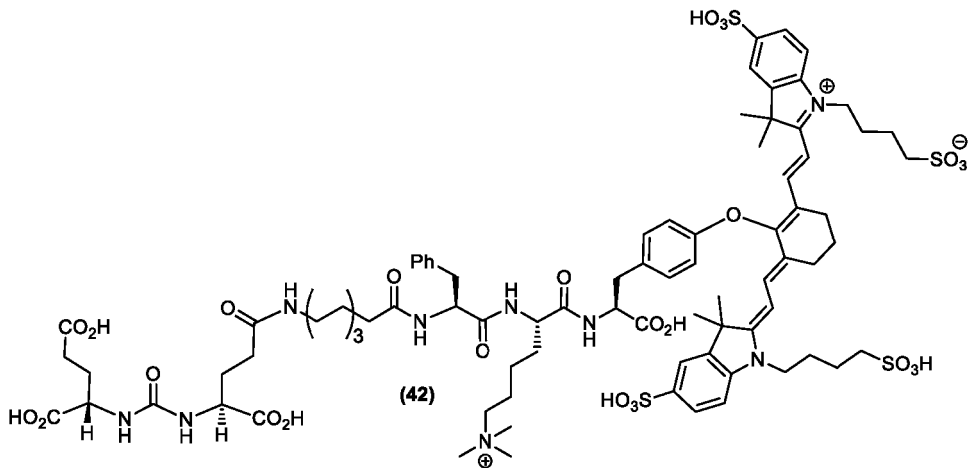


En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



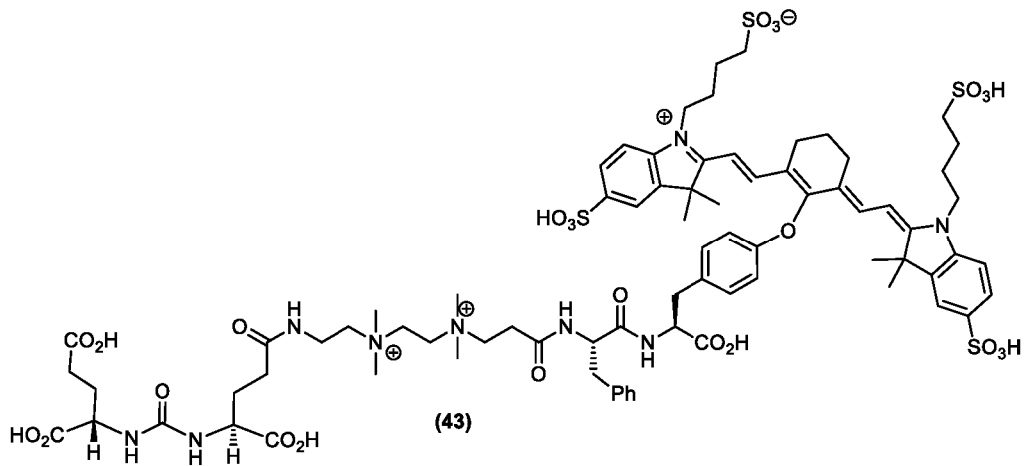
5

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

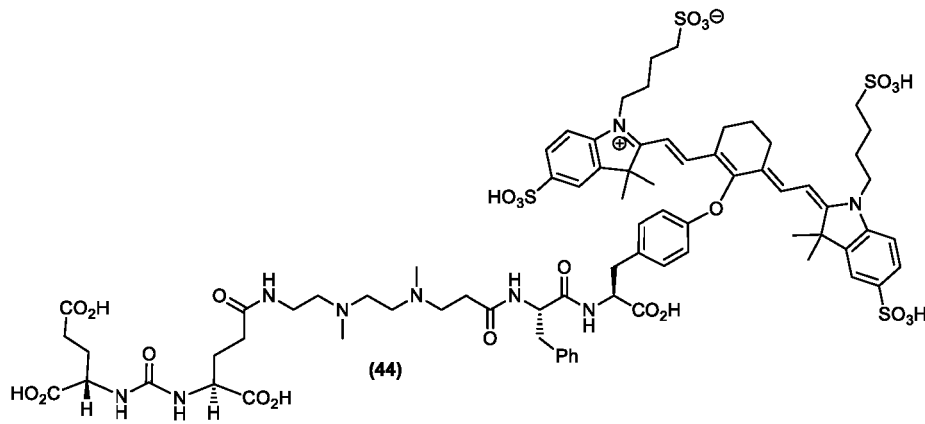


10

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

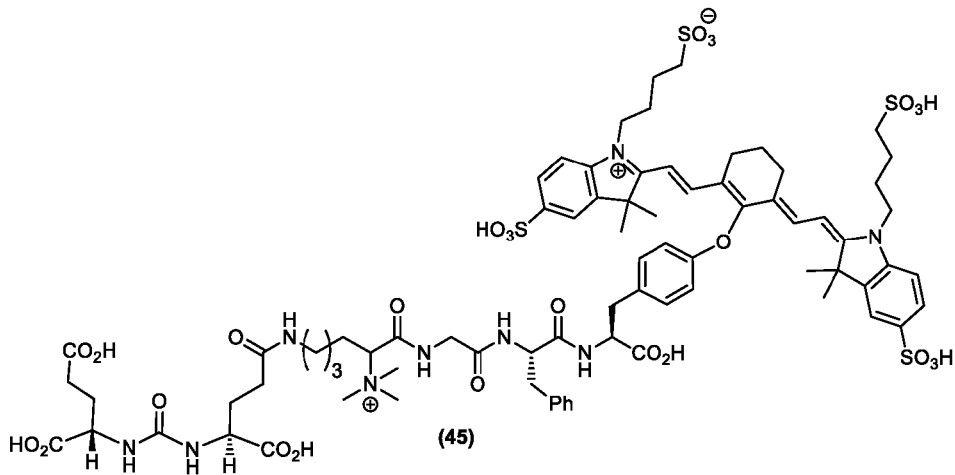


En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



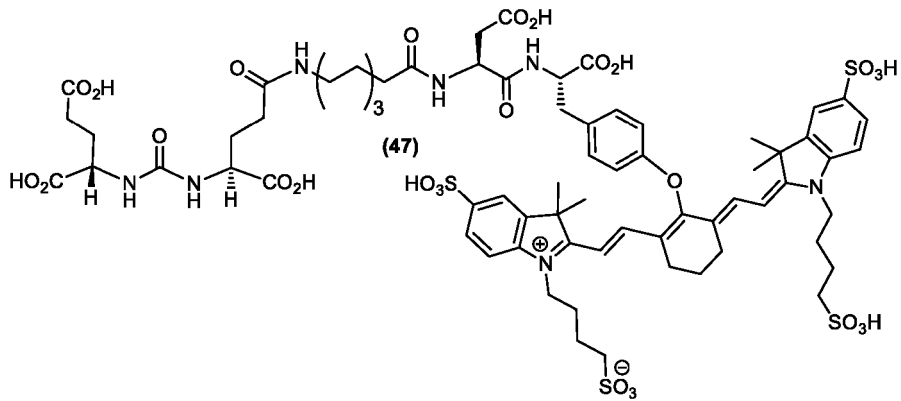
5

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

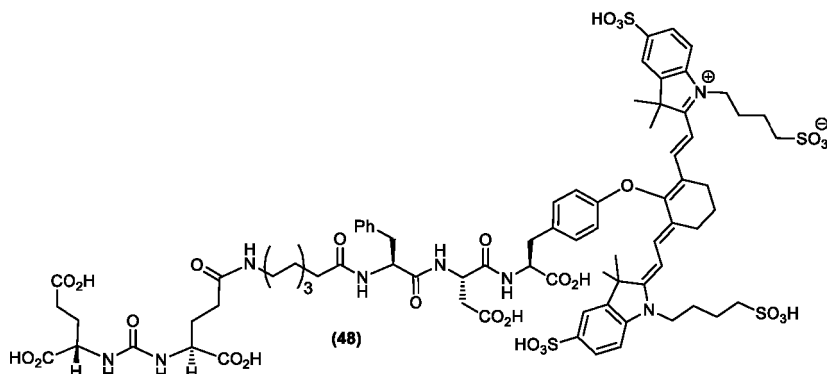


10

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

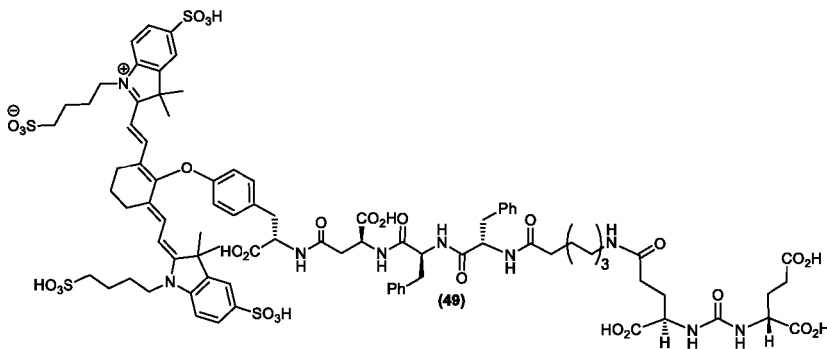


En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



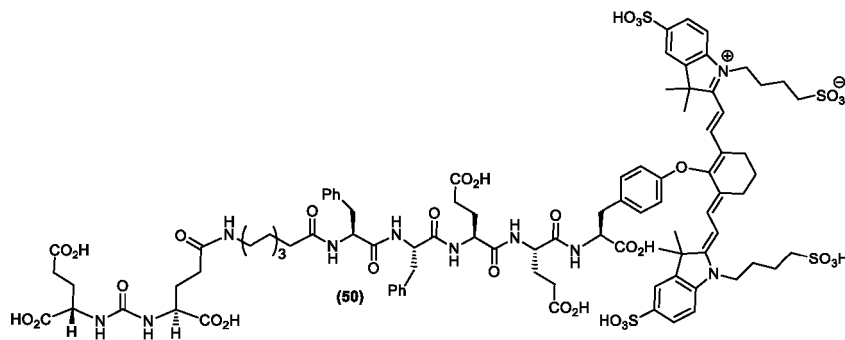
5

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



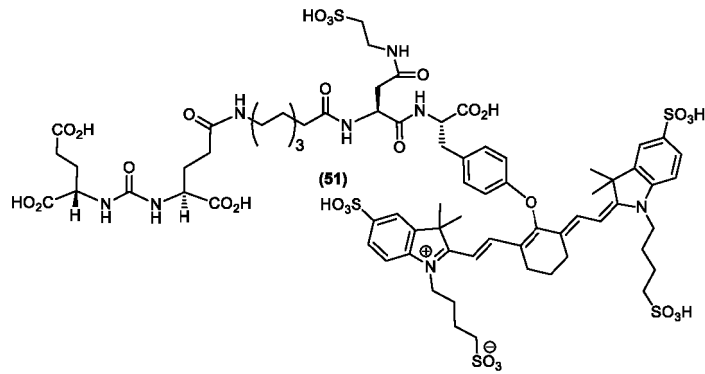
10

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

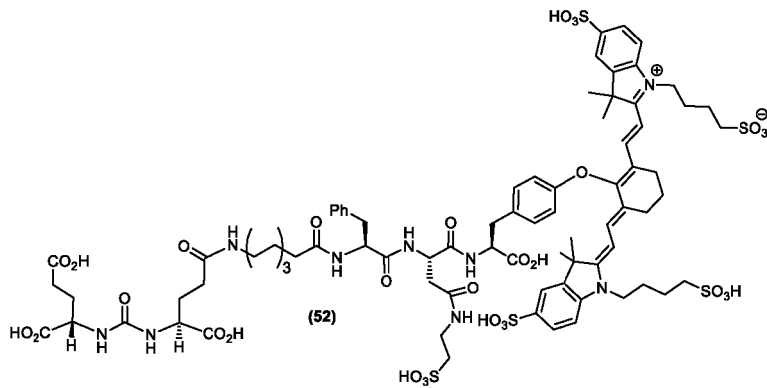


15

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

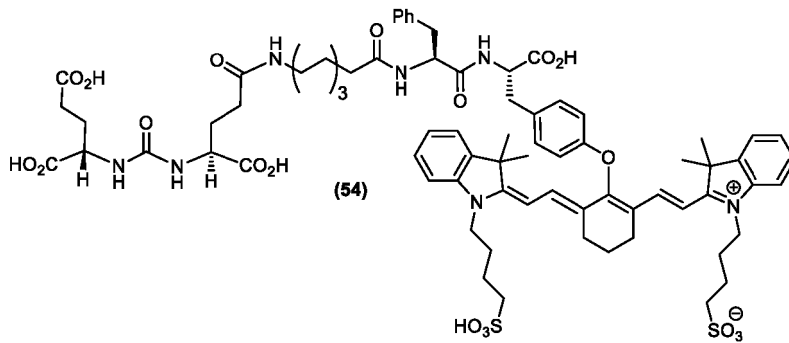


En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



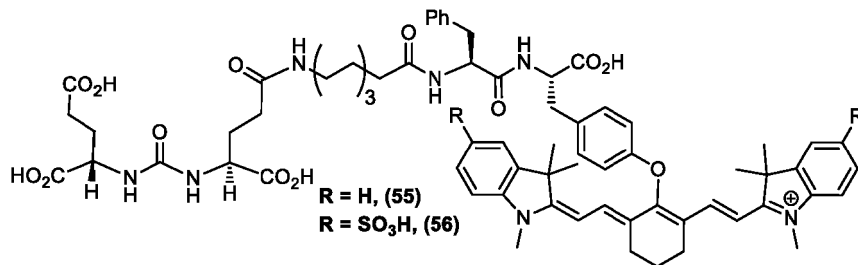
5

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

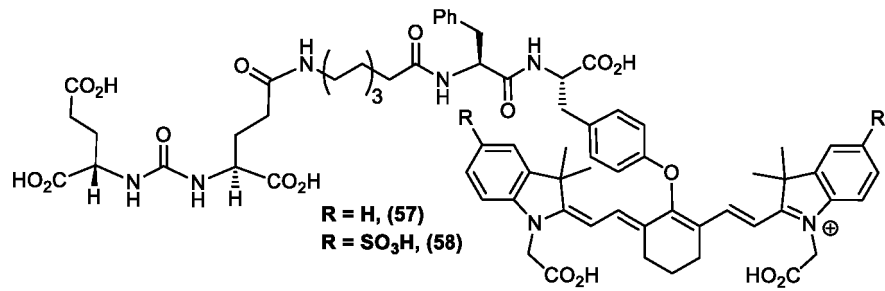


10

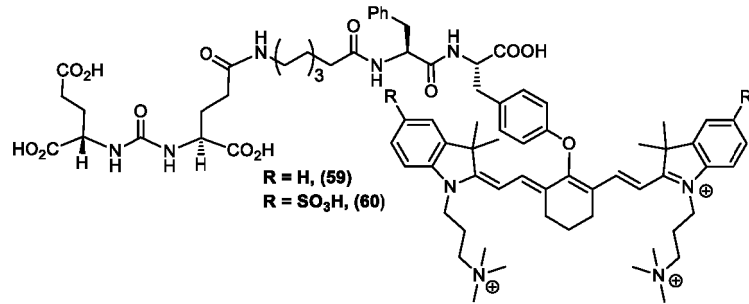
En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



15 En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

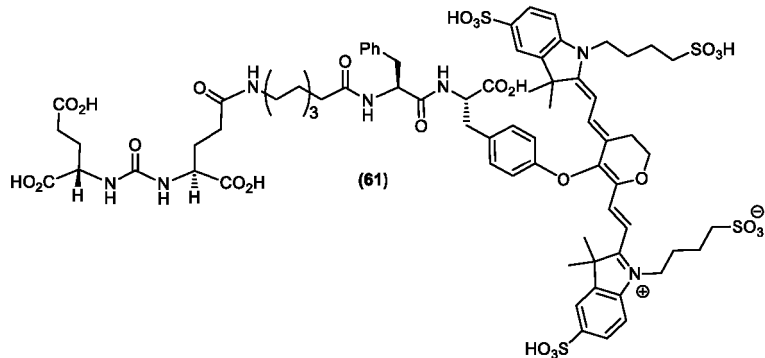


En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



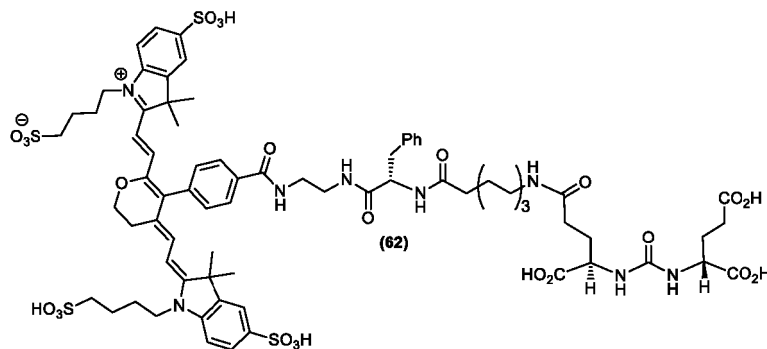
5

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

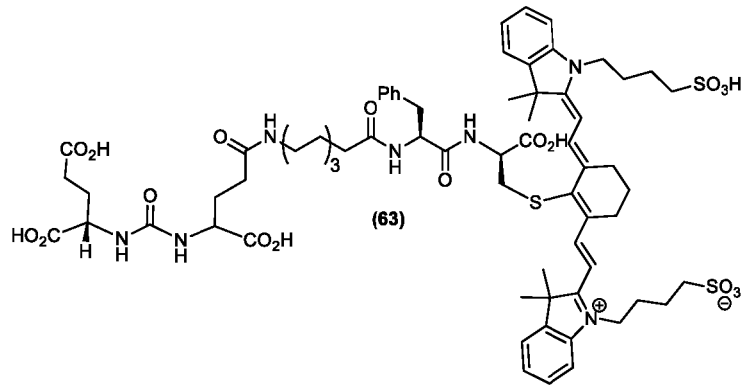


10

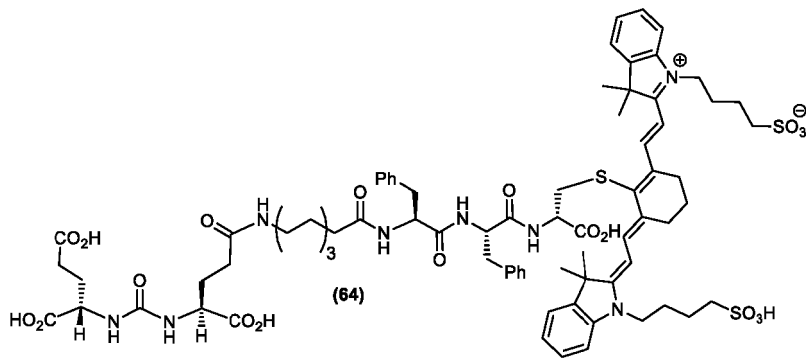
En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



15 En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

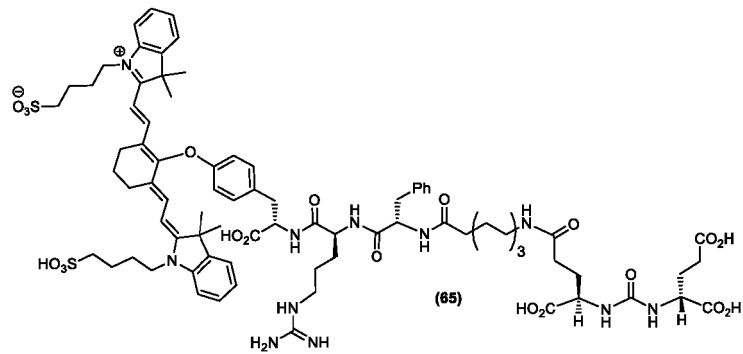


En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



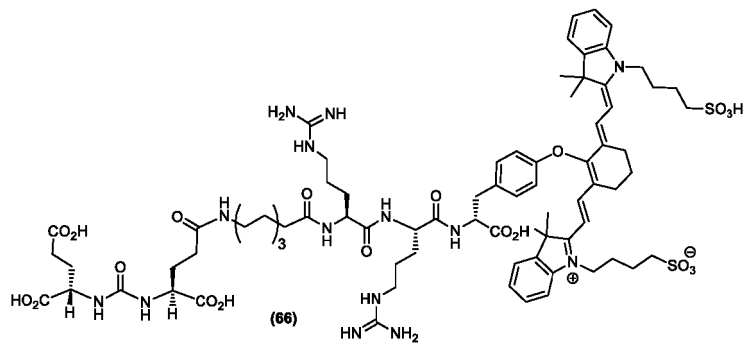
5

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

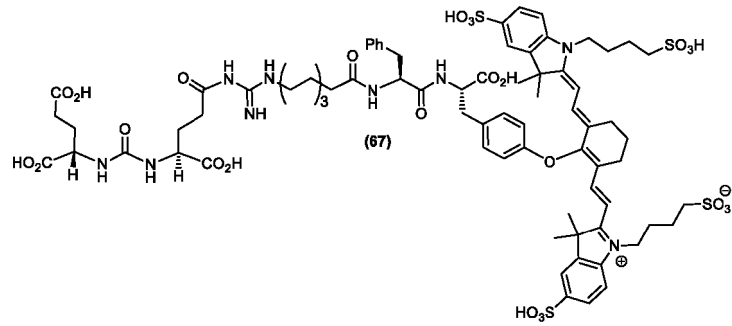


10

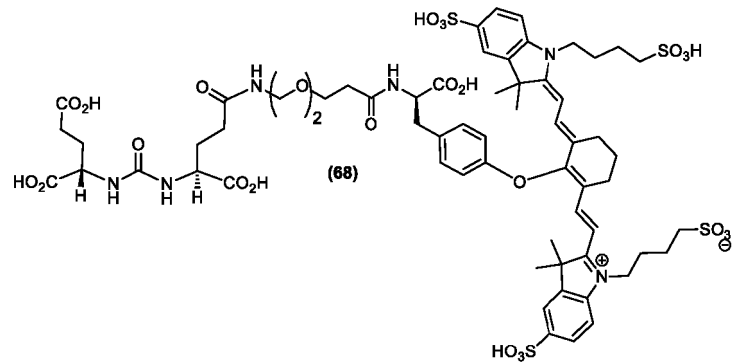
En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



15 En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

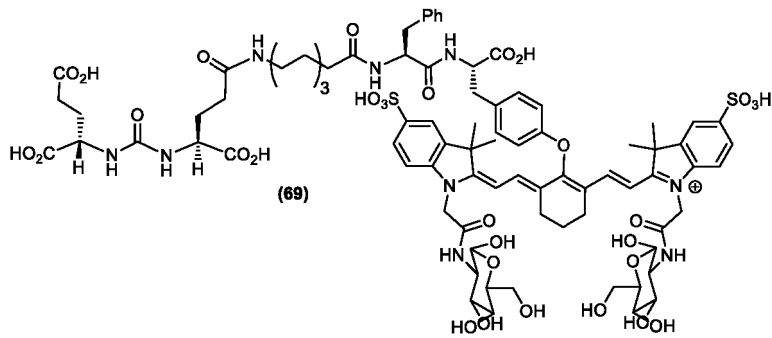


En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



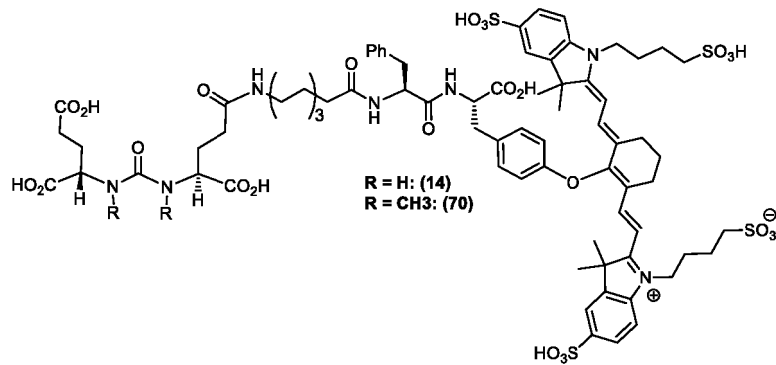
5

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

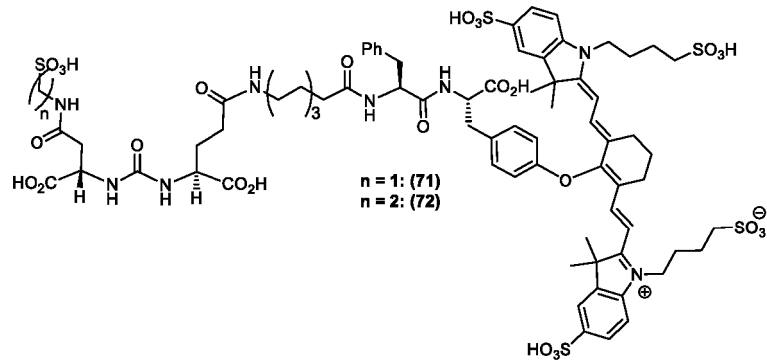


10

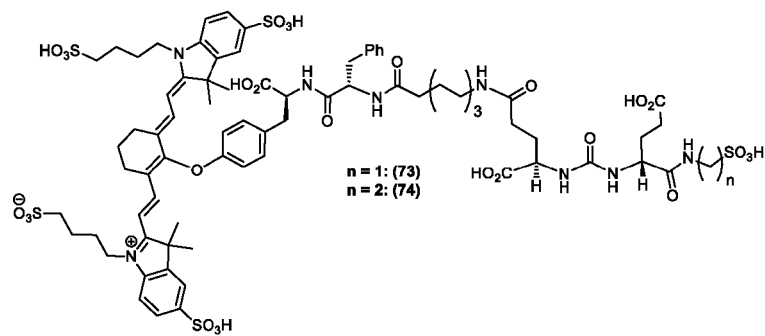
En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



15 En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

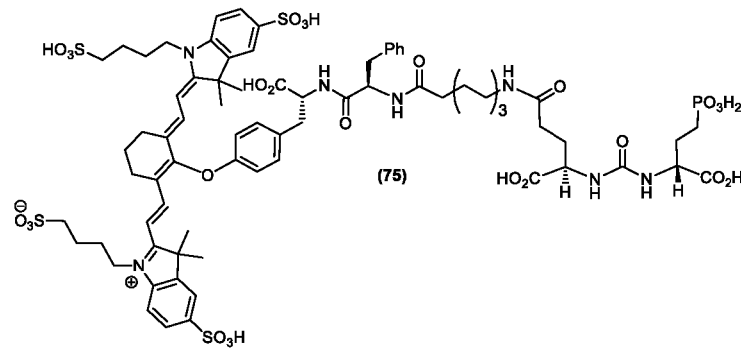


En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



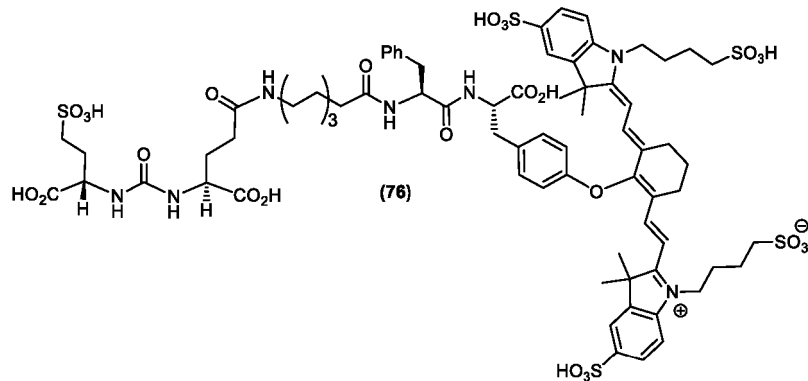
5

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

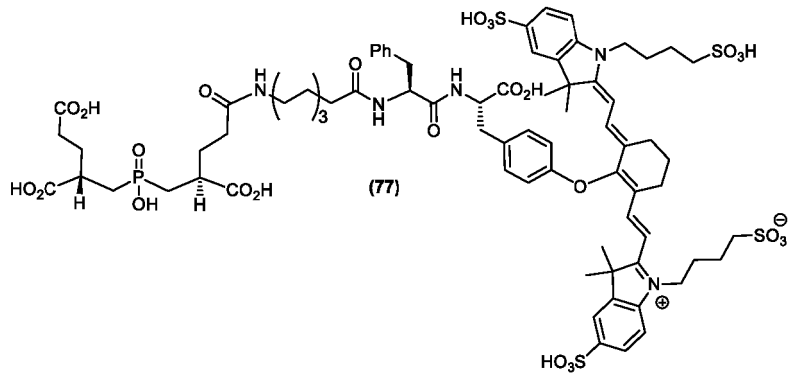


10

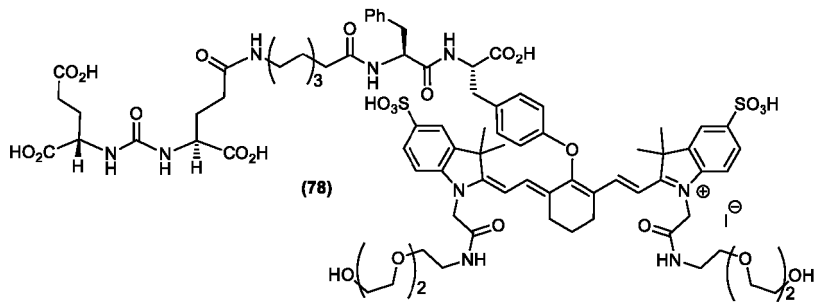
En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



15 En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

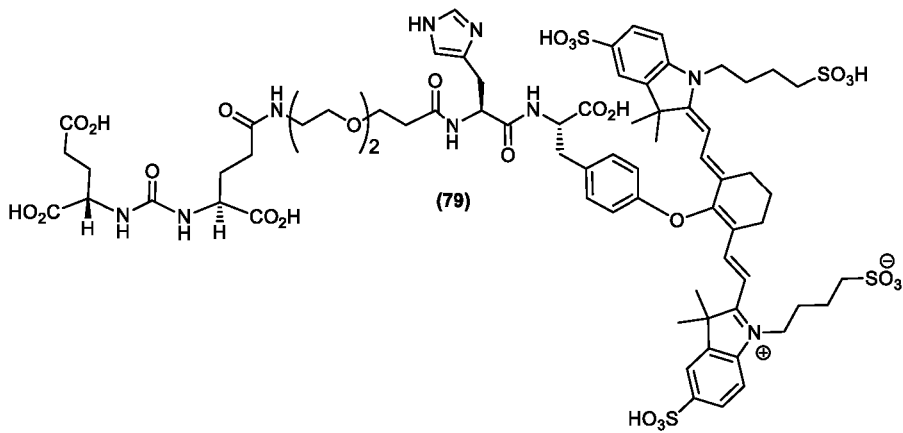


En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



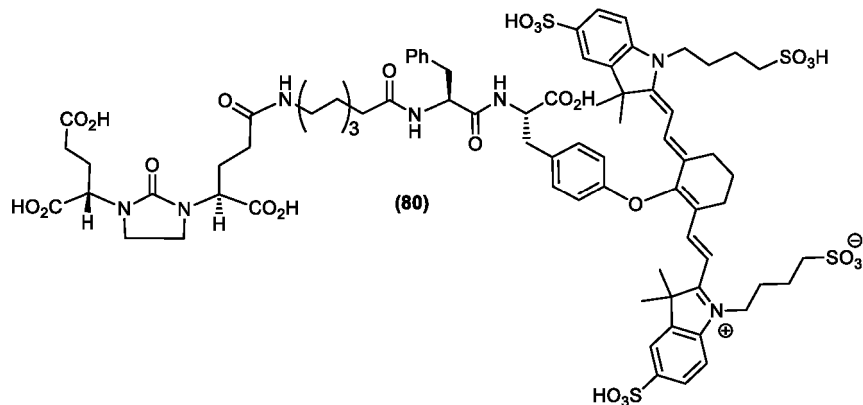
5

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

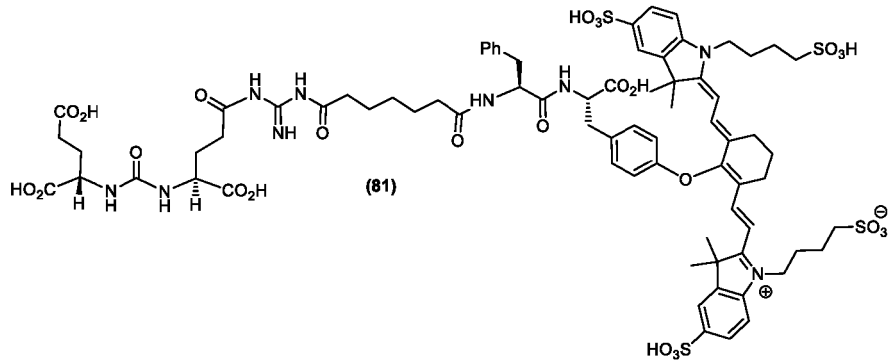


10

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

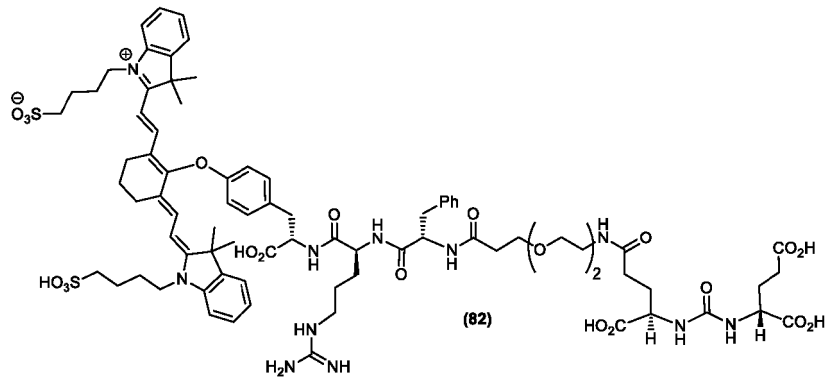


15 En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

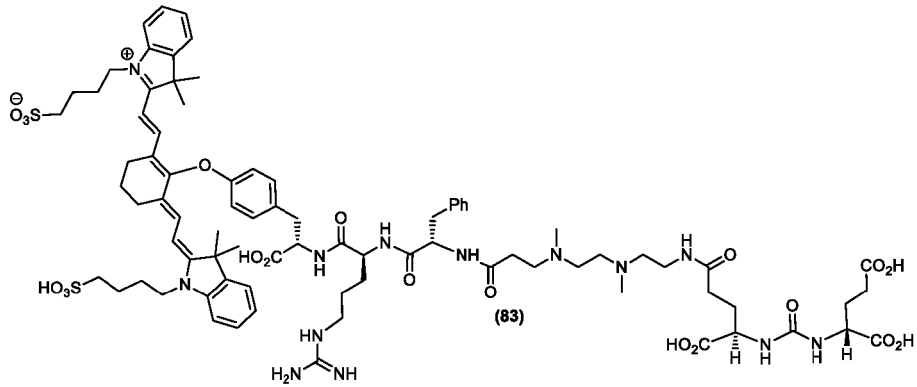


En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

5

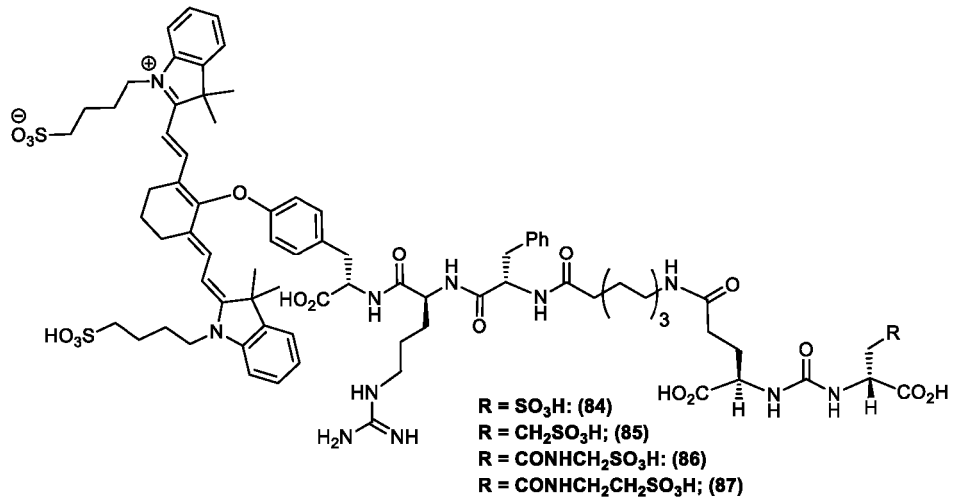


En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

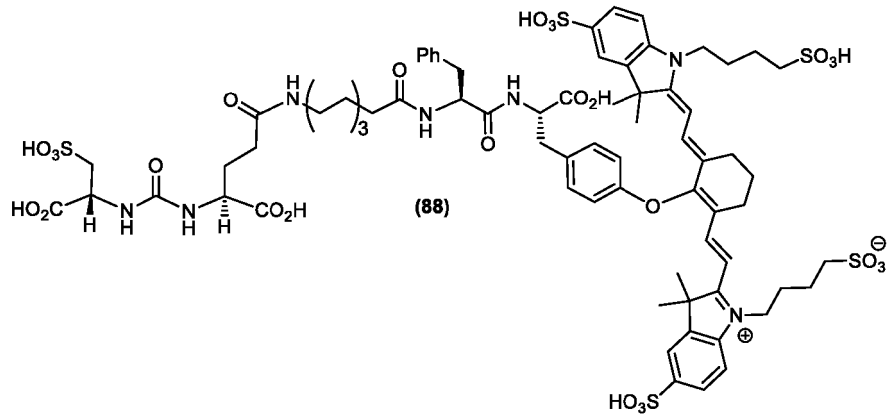


10

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

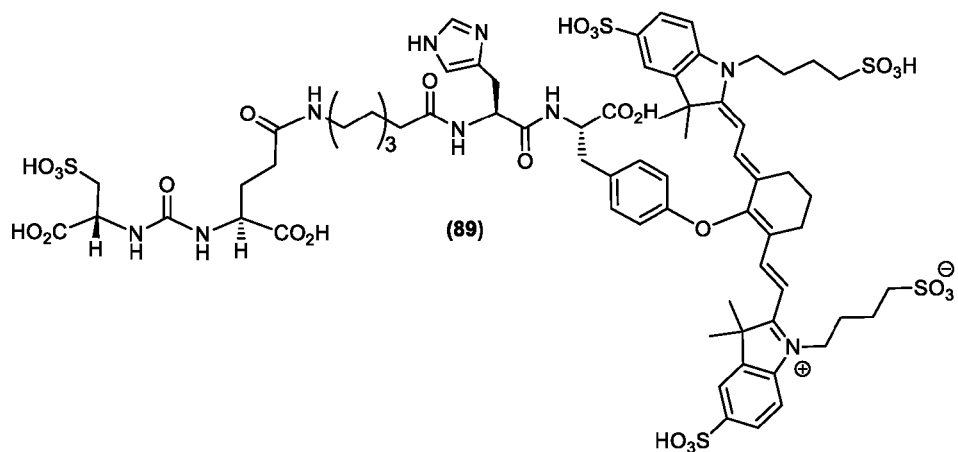


En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



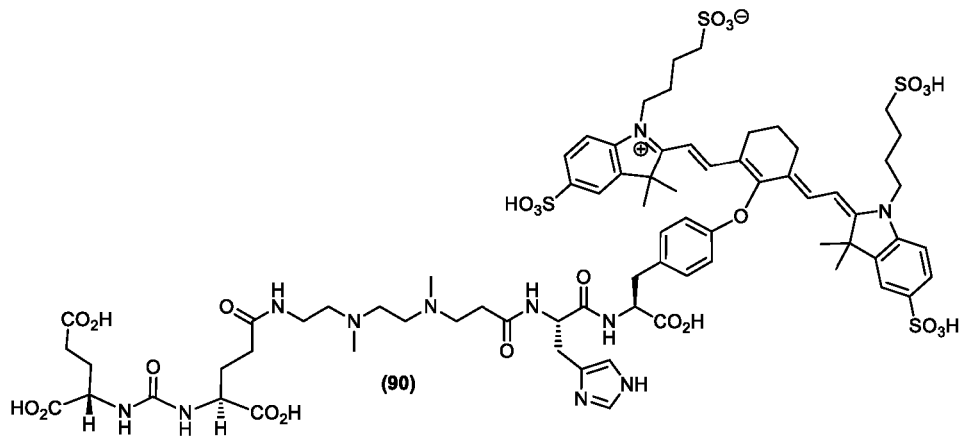
5

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

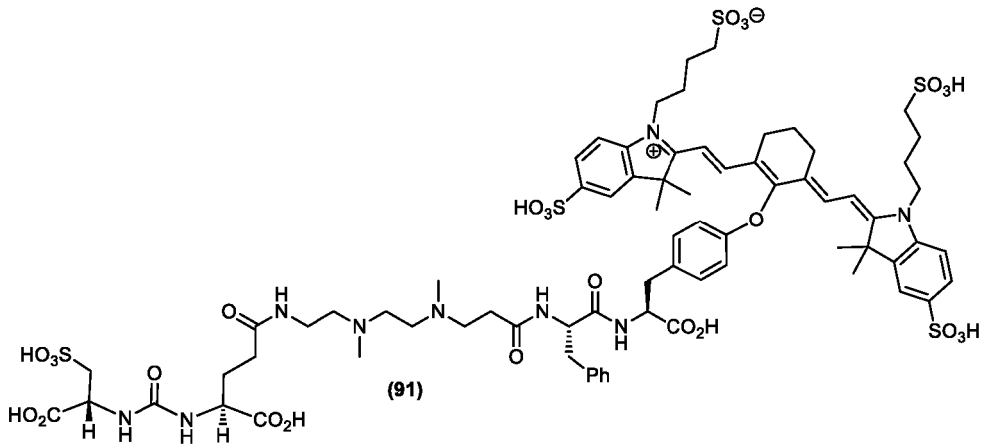


10

En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

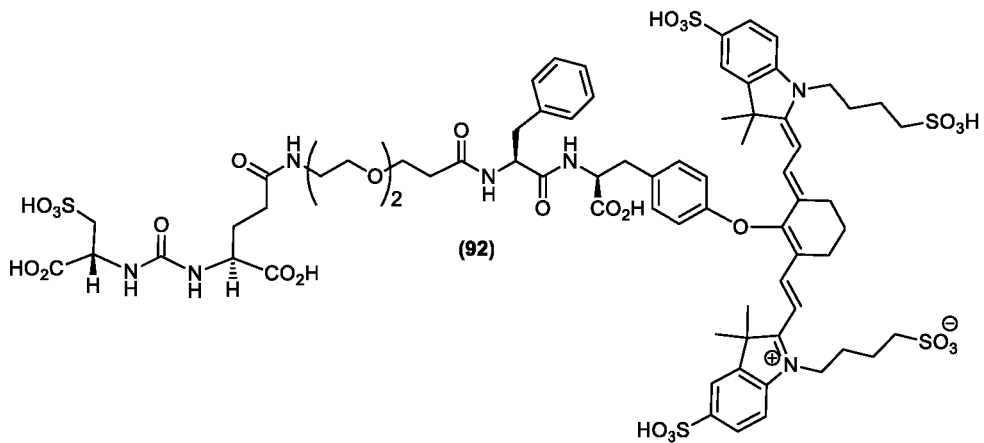


En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:



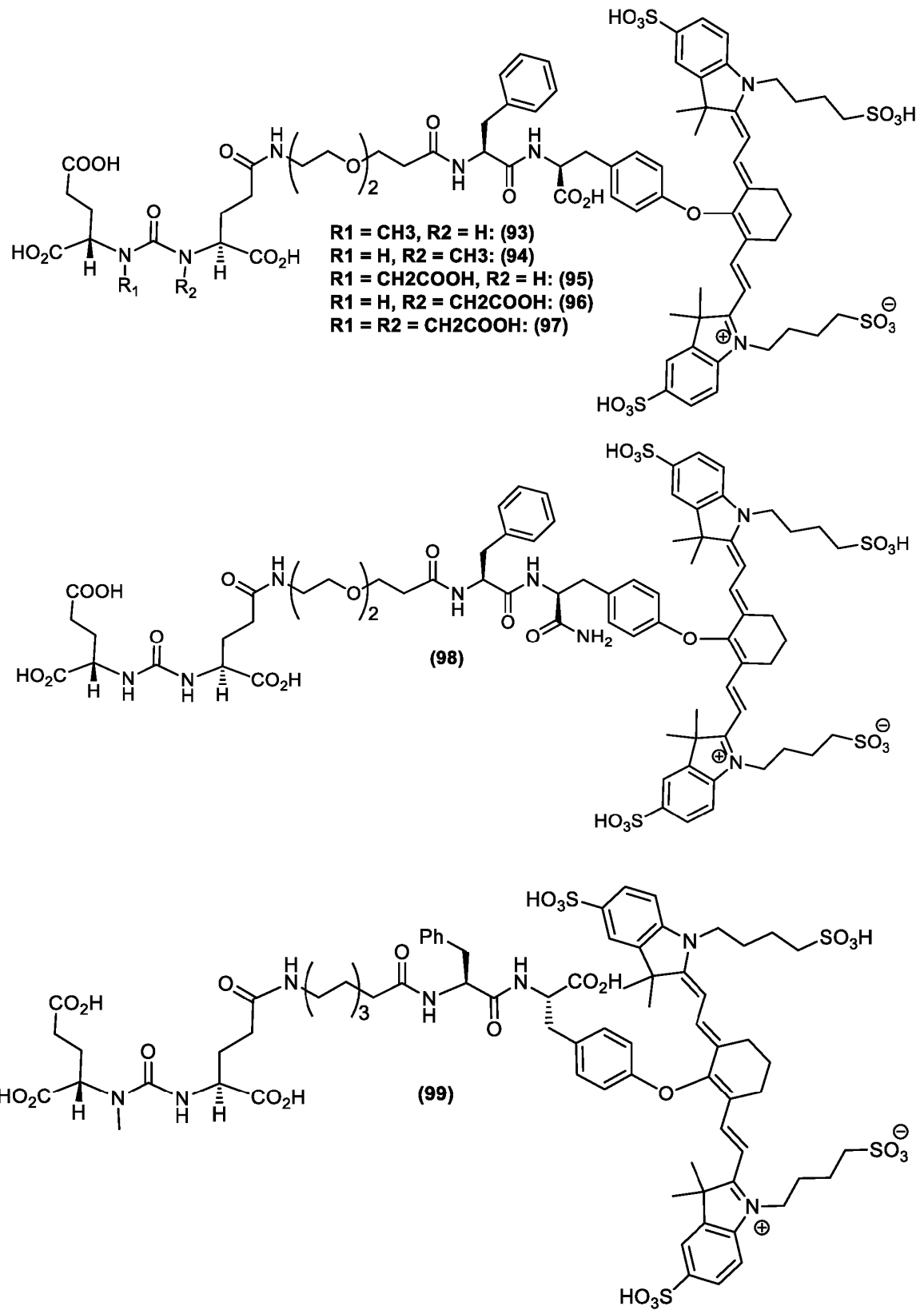
5

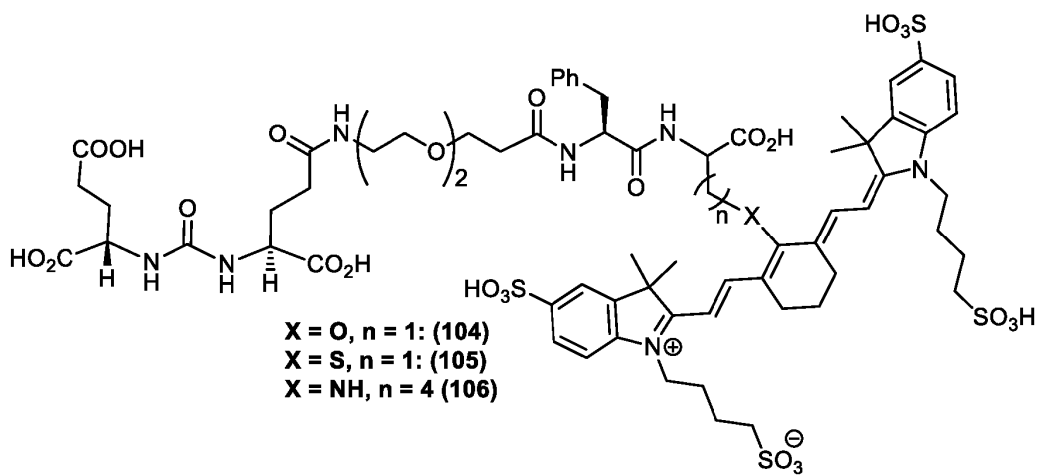
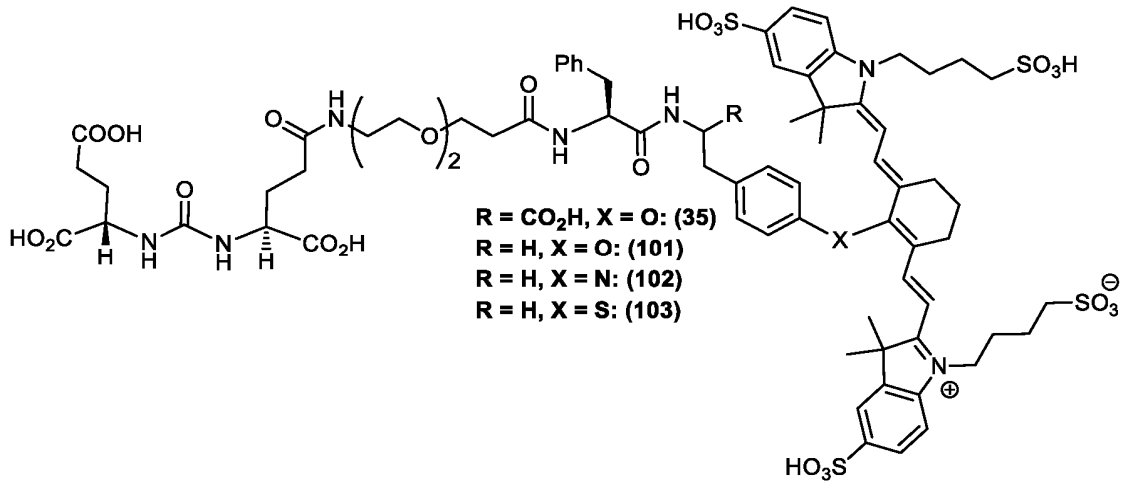
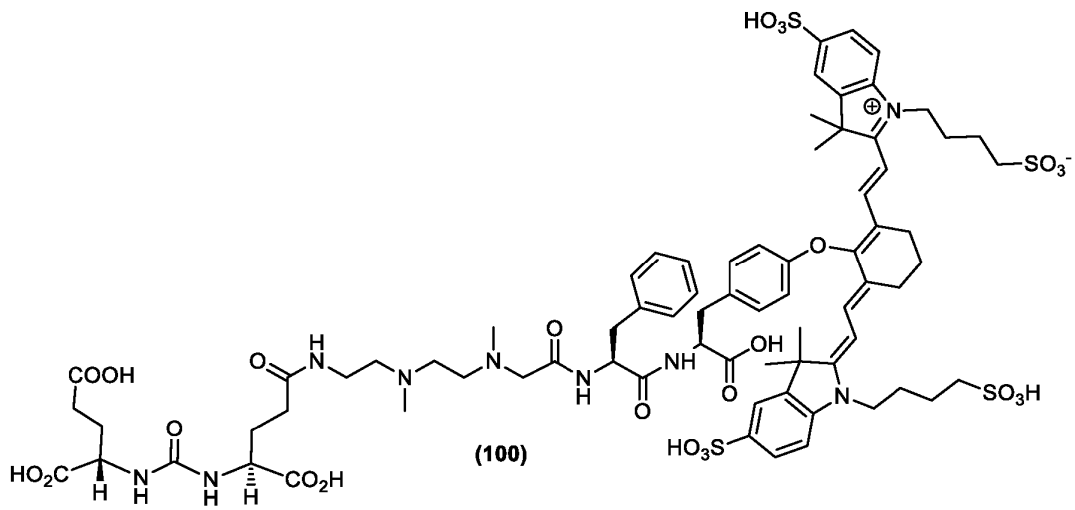
En algunas realizaciones, la presente invención incluye un compuesto que tiene la fórmula estructural:

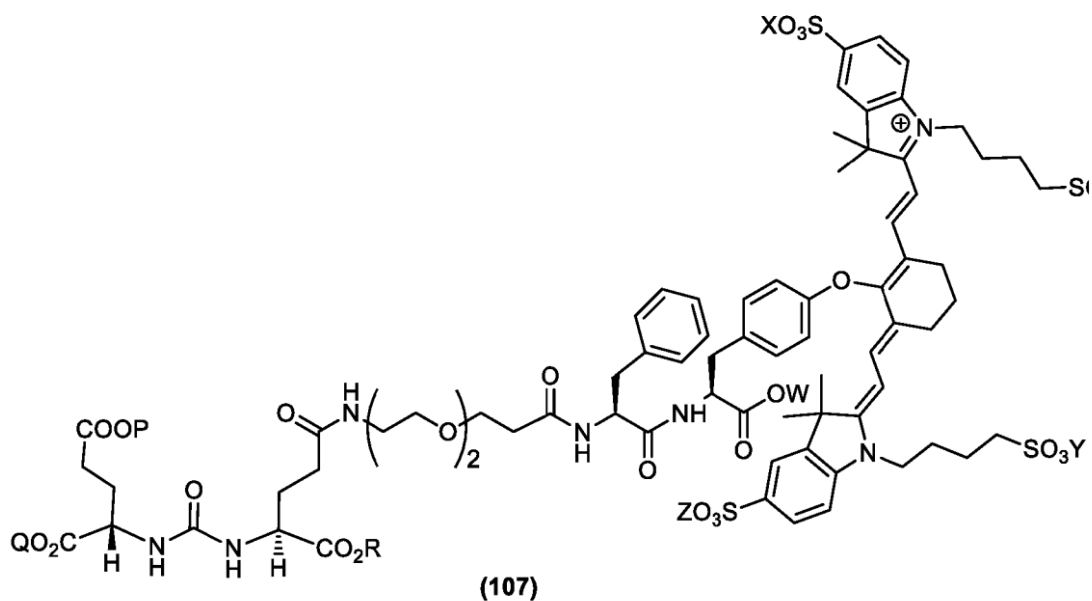


10

Algunos compuestos preferidos adicionales de la invención incluyen los siguientes:

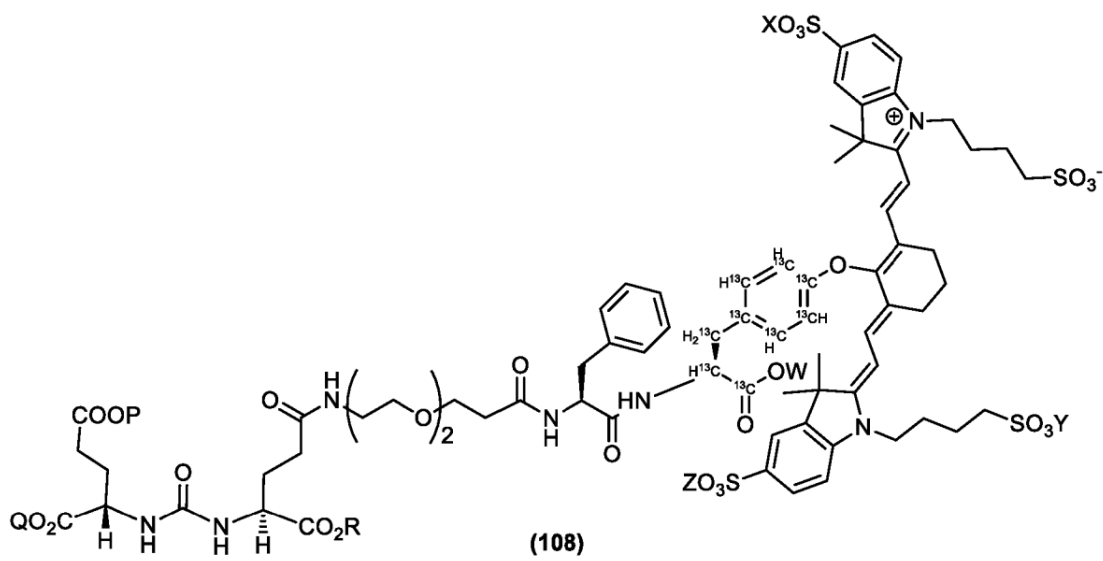






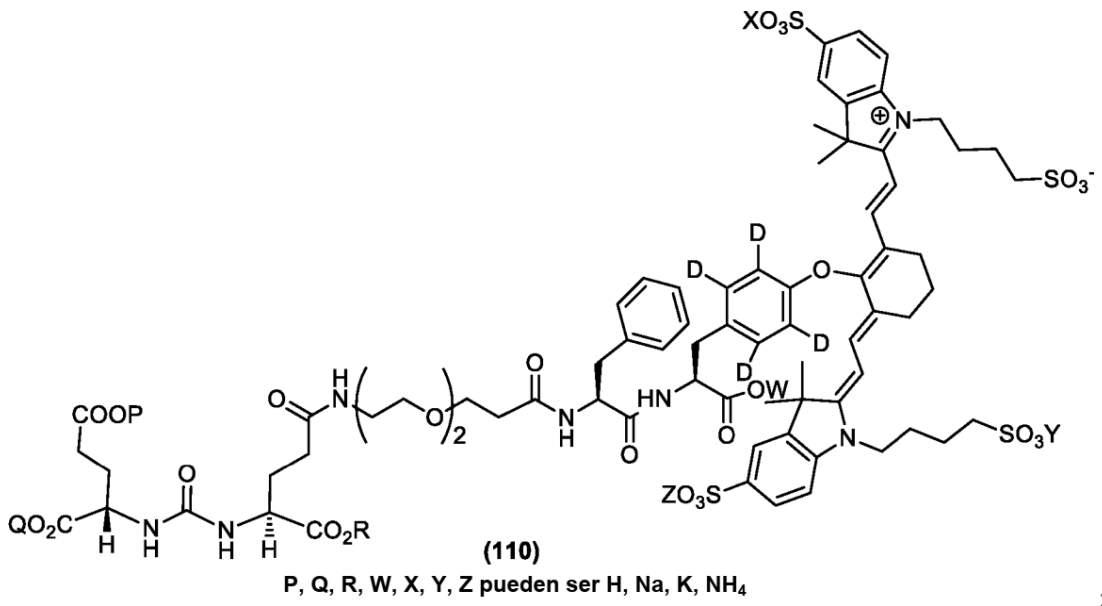
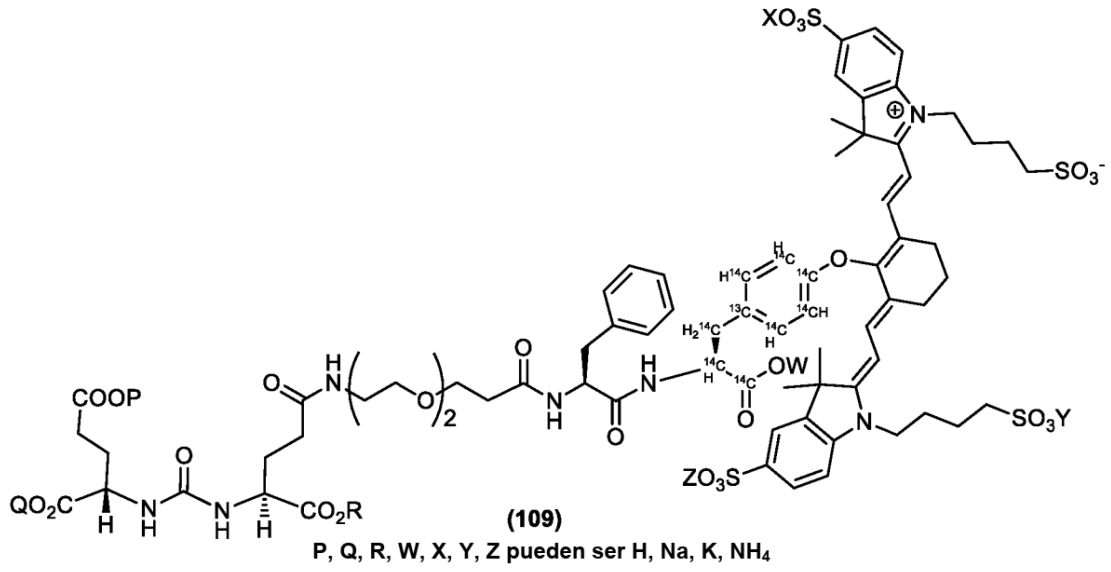
P, Q, R, W, X, Y, Z pueden ser H (35), Na, K, NH₄

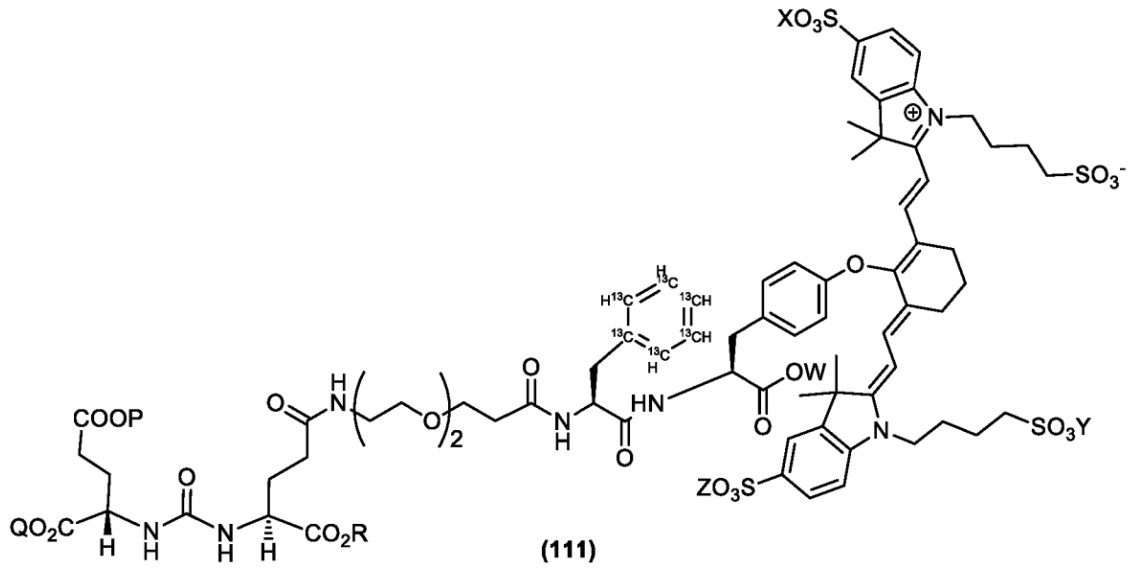
;



P, Q, R, W, X, Y, Z pueden ser H, Na, K, NH₄

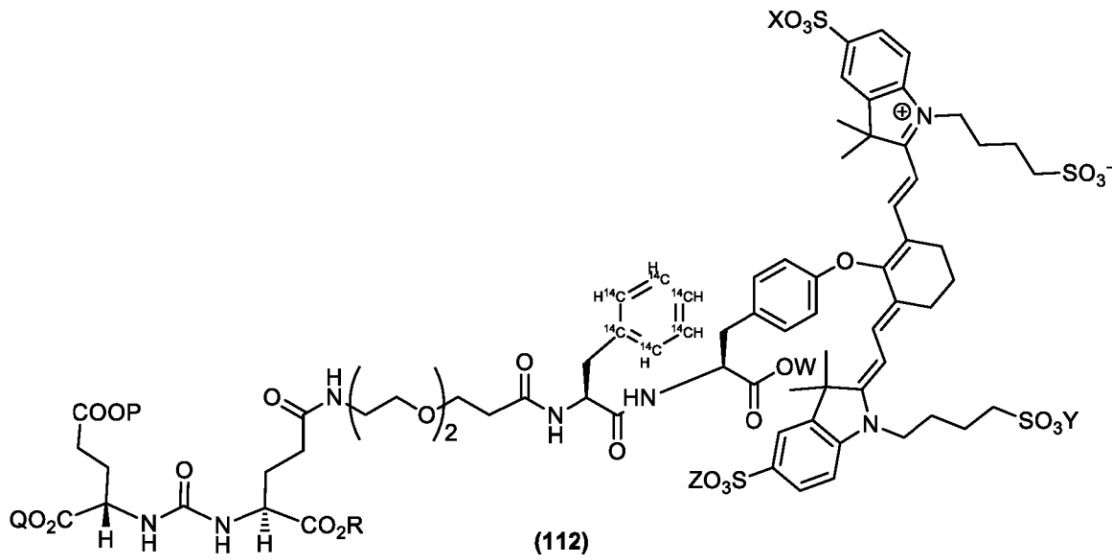
;





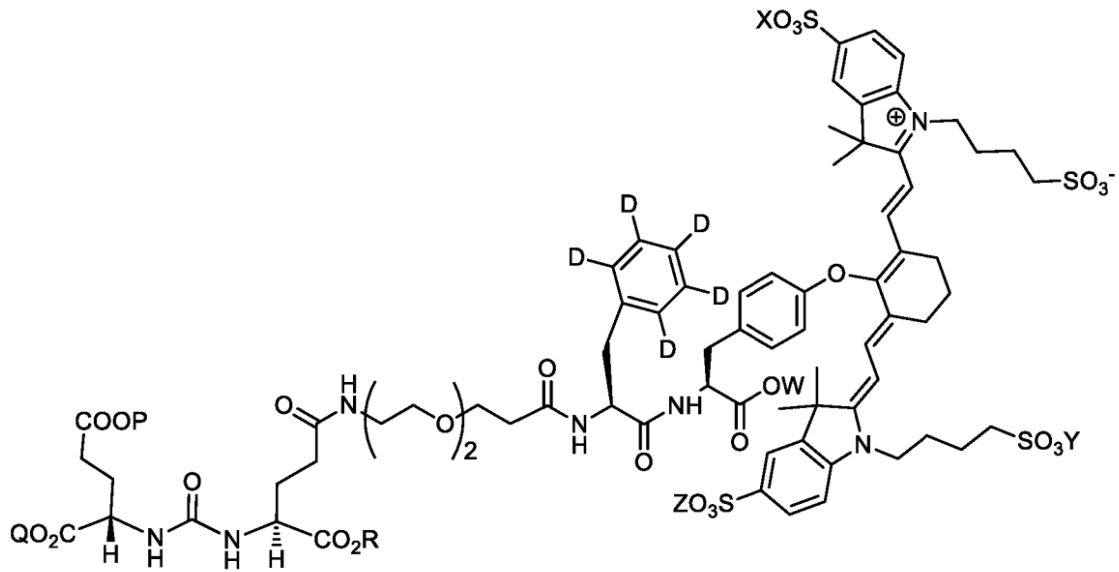
P, Q, R, W, X, Y, Z pueden ser H, Na, K, NH₄

;



P, Q, R, W, X, Y, Z pueden ser H, Na, K, NH₄

;

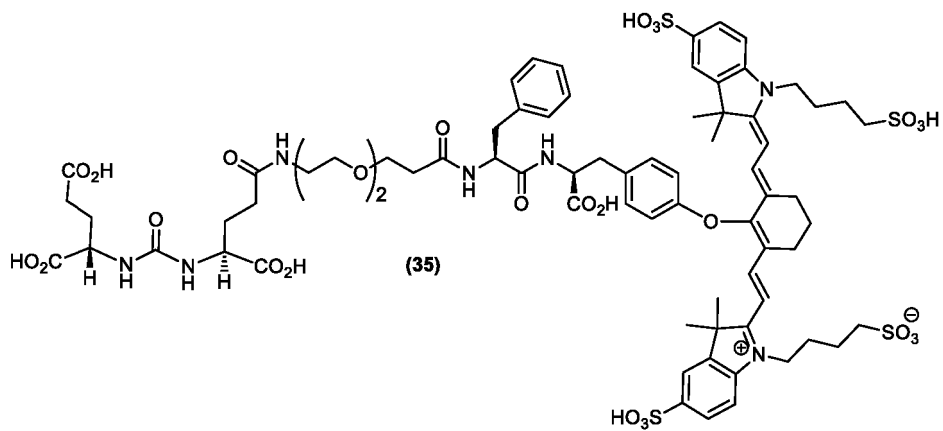


(113)

P, Q, R, W, X, Y, Z pueden ser H (35), Na, K, NH₄

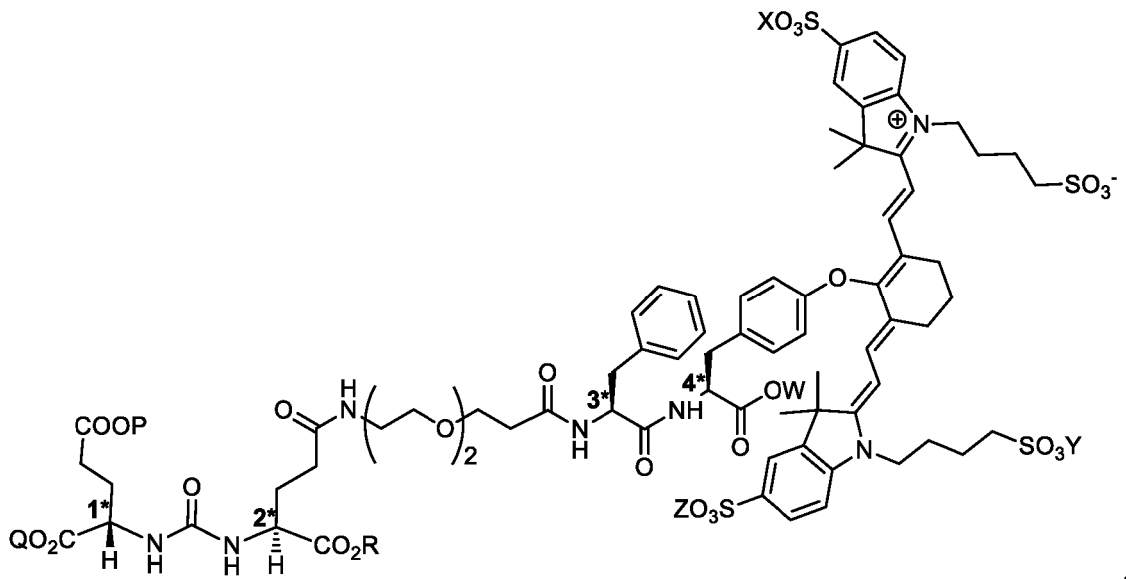
y

5 En la presente invención se prefiere particularmente un compuesto de la estructura 35.



(35)

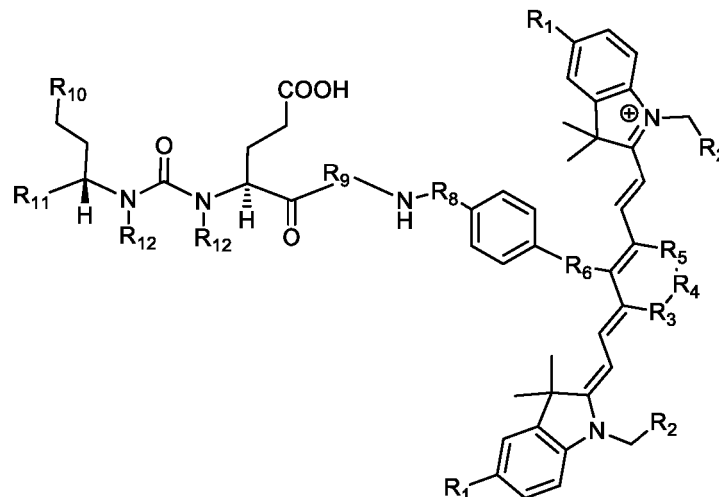
10 Además, se contempla que los estereoisómeros del compuesto 35, tales como los mostrados en la siguiente tabla, también sean útiles colorantes del infrarrojo cercano (NIR) dirigidos al PSMA.



Centro quiral \ Compuesto	1*	2*	3*	4*
35	M	M	M	M
114	M	M	M	D
115	M	M	D	M
116	M	M	D	D
117	M	D	M	M
118	M	D	M	D
119	M	D	D	M
120	M	D	D	D
121	D	M	M	M
122	D	M	M	D
123	D	M	D	M
124	D	M	D	D
125	D	D	M	M
126	D	D	M	D
127	D	D	D	M
128	D	D	D	D

Nota: el centro quiral se indica como *

5 La presente invención también se refiere a un compuesto que tiene la fórmula estructural:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o isótopos del mismo, en donde:

R₁ representa un hidrógeno o SO₃H;

R₂ representa un hidrógeno o CH₃ o C₃H₆SO₃⁻ o C₃H₆SO₃H o C₄H₈SO₃⁻ o C₄H₈SO₃H o C₃H₆N⁺(CH₃)₃;

R₃, y R₅ representan cada uno un carbono, opcionalmente uno o más enlaces compartidos, u oxígeno o azufre, o nitrógeno

5 R₄ representa un carbono opcionalmente con uno o más enlaces compartidos;

R₆ representa nitrógeno, oxígeno o azufre o ningún átomo (enlace directo C-C entre el anillo aromático y el anillo de vinilo);

R₇ es opcional y, cuando está presente, representa un grupo sustituyente aromático donante de electrones;

10 R₈ es opcional y, cuando está presente, representa conectores con aminoácidos aromáticos tales como Phe, Trp, His, Tyr, y/o aminoácidos catiónicos como Arg, Lys, y/o aminoácidos aniónicos tales como Asp, Glu, y/o aminoácidos no naturales de ácidos aromáticos/catiónicos/aniónicos;

R₉ es opcional y, cuando está presente, representa una cadena carbonada lineal, o conectores de polietilenglicol, conectores de polietilenamina, conector catiónico,;

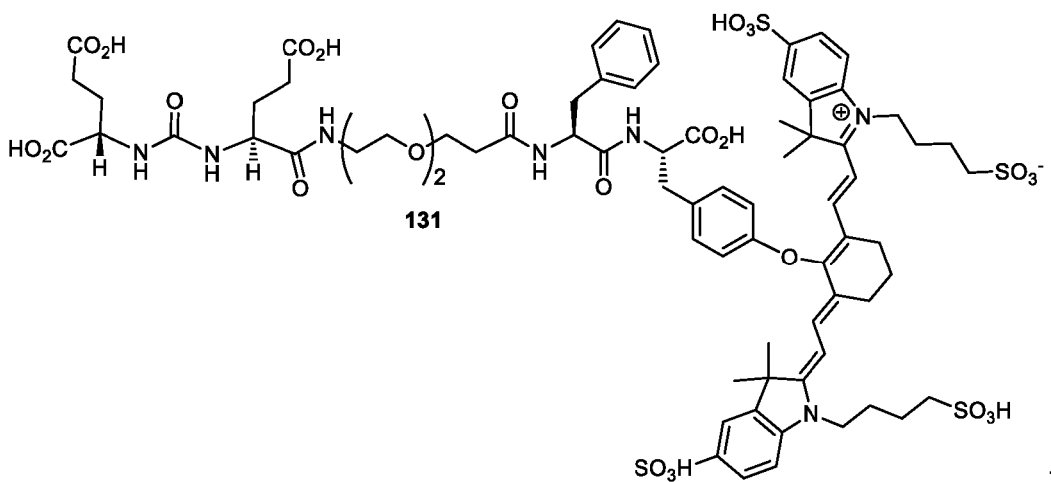
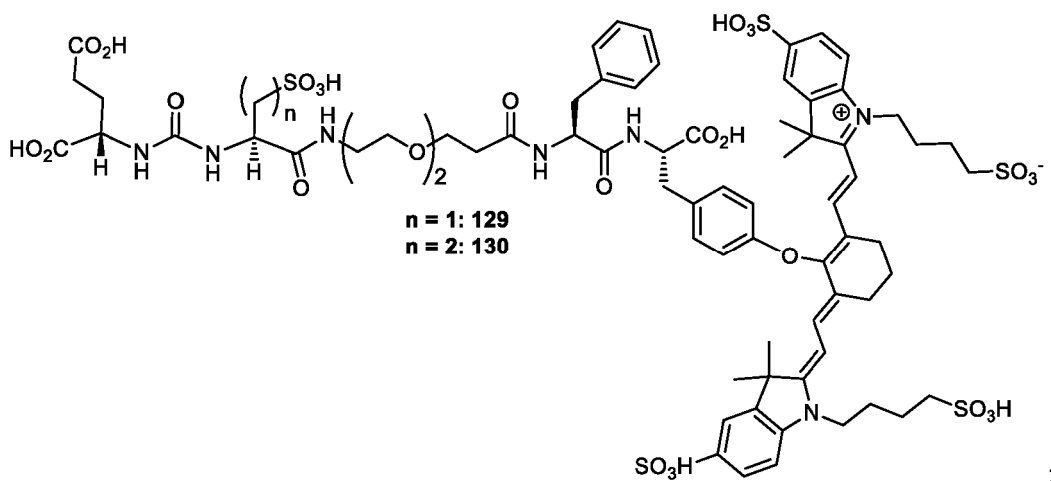
15 R₁₀ representa un CO₂H, PO₃H₂, SO₃H, CH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂CH₂SO₃H;

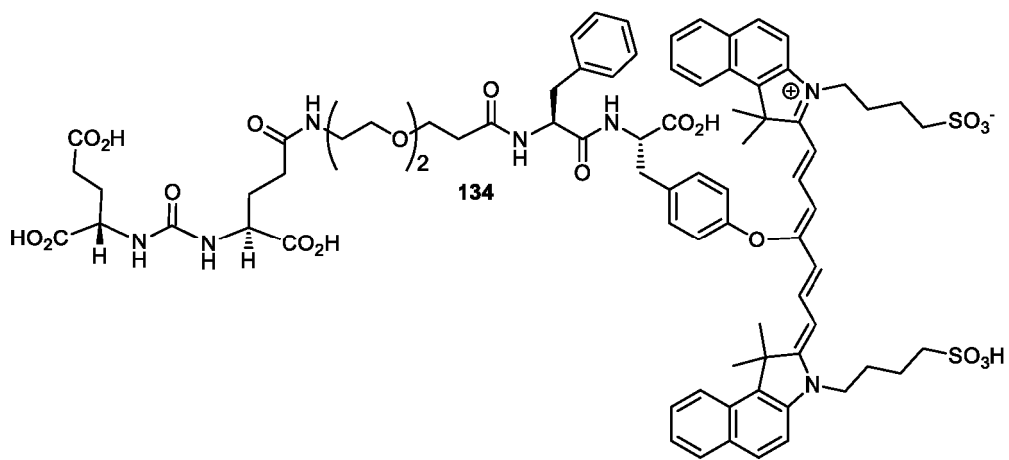
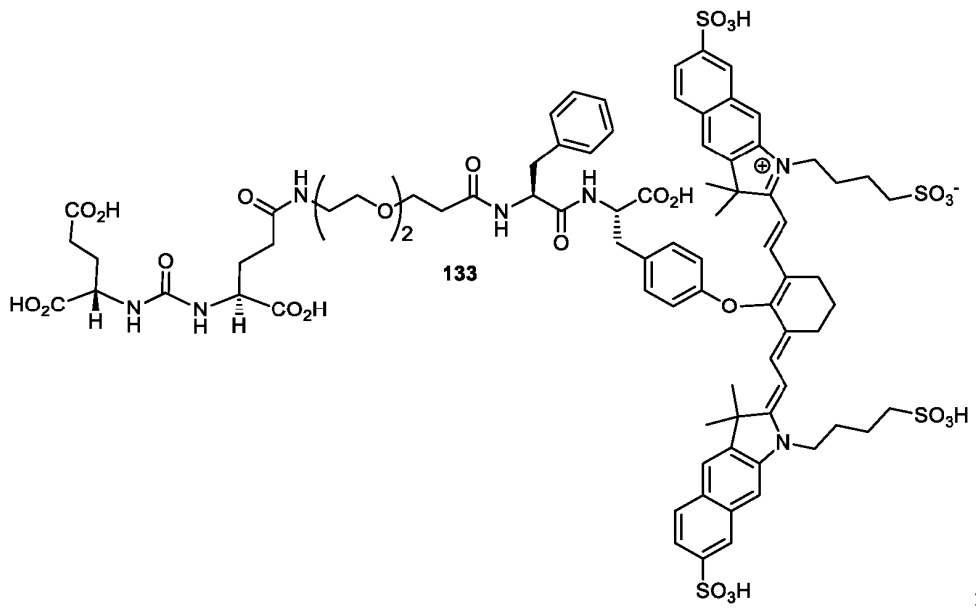
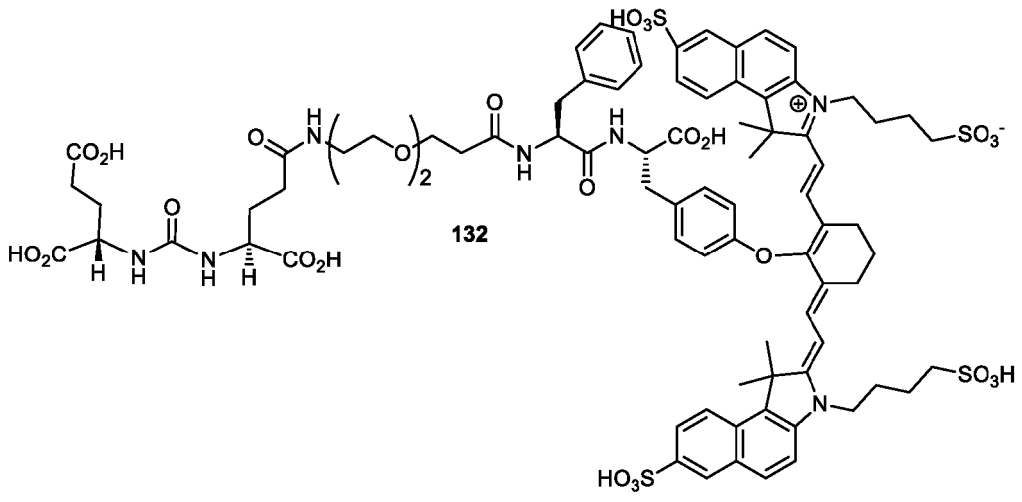
R₁₁ representa CO₂H, SO₃H, CH₂CONHCH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂CH₂SO₃H; y

R₁₂ representa independientemente representa un hidrógeno, un grupo metilo, CH₂COOH, un CH₂ y cada uno puede representar, opcionalmente, un CH₂ que comparte un enlace.

Algunos compuestos preferidos adicionales de la invención incluyen los siguientes:

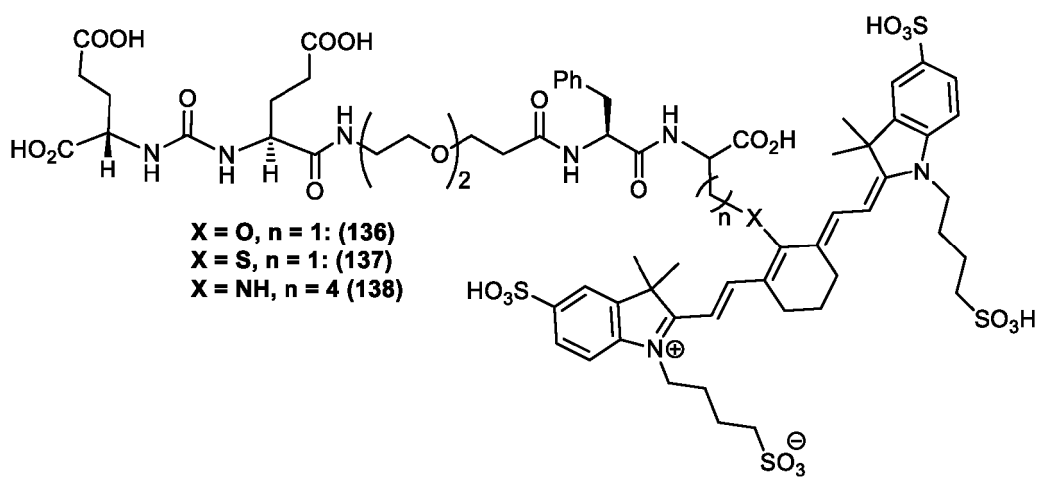
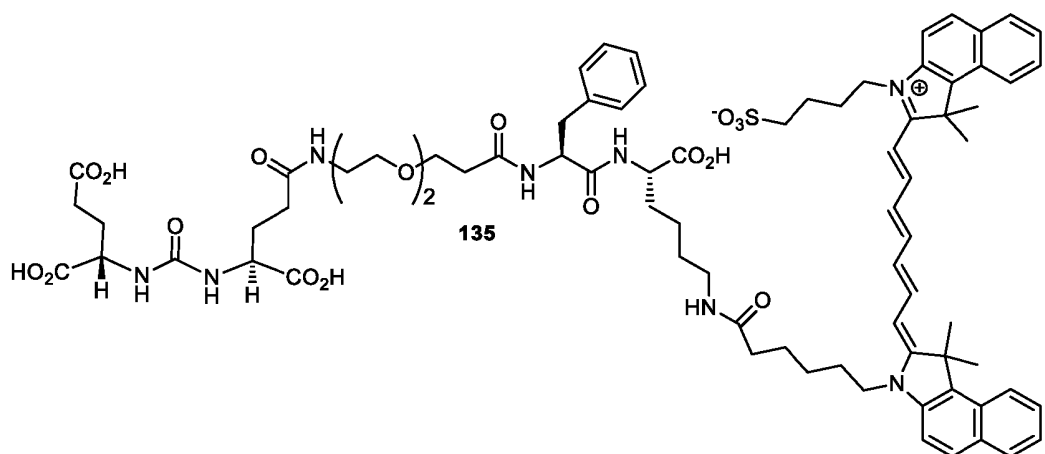
20

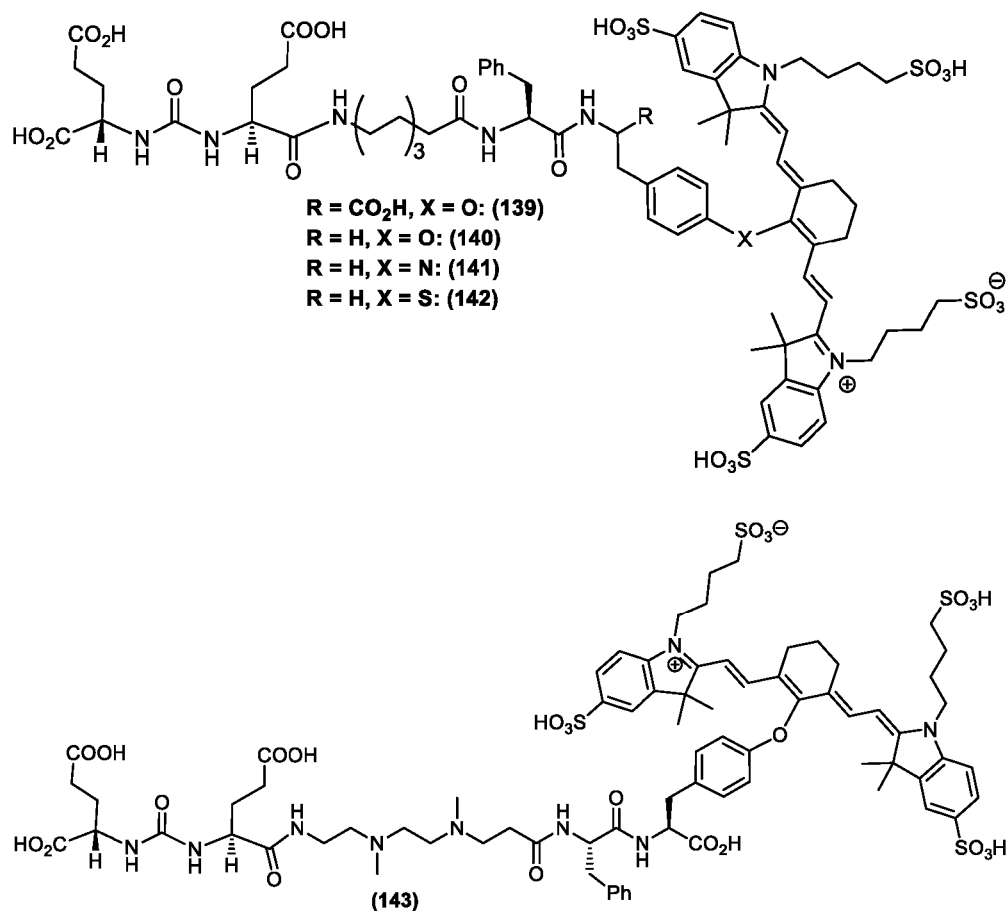




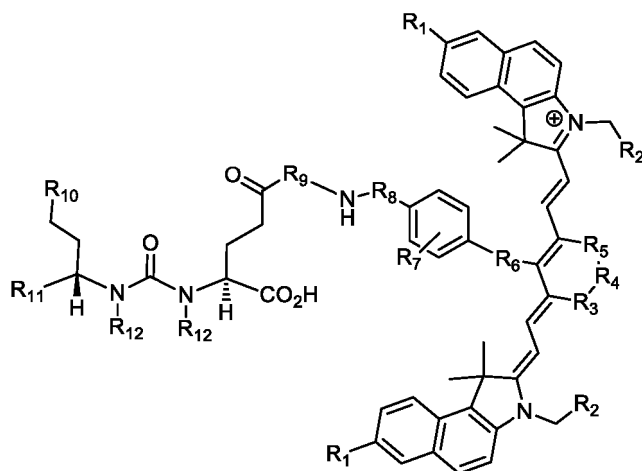
5

y





La presente invención también se refiere a un compuesto que tiene la fórmula estructural:



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R₁ representa un hidrógeno o SO₃H;

R₂ representa un hidrógeno o CH₃ o C₃H₆SO₃⁻ o C₃H₆SO₃H o C₄H₈SO₃⁻ o C₄H₈SO₃H o C₃H₆N⁺(CH₃)₃;

10 R₃, y R₅ representan cada uno un carbono, opcionalmente uno o más enlaces compartidos, u oxígeno o azufre, o nitrógeno

R₄ representa un carbono opcionalmente con uno o más enlaces compartidos;

R₆ representa nitrógeno, oxígeno o azufre o ningún átomo (enlace directo C-C entre el anillo aromático y el anillo de vinilo);

15 R₇ es opcional y, cuando está presente, representa un grupo sustituyente aromático donante de electrones;

R₈ es opcional y, cuando está presente, representa conectores con aminoácidos aromáticos tales como Phe, Trp, His, Tyr, y/o aminoácidos catiónicos como Arg, Lys, y/o aminoácidos aniónicos tales como Asp, Glu, y/o aminoácidos no naturales de ácidos aromáticos/catiónicos/aniónicos;

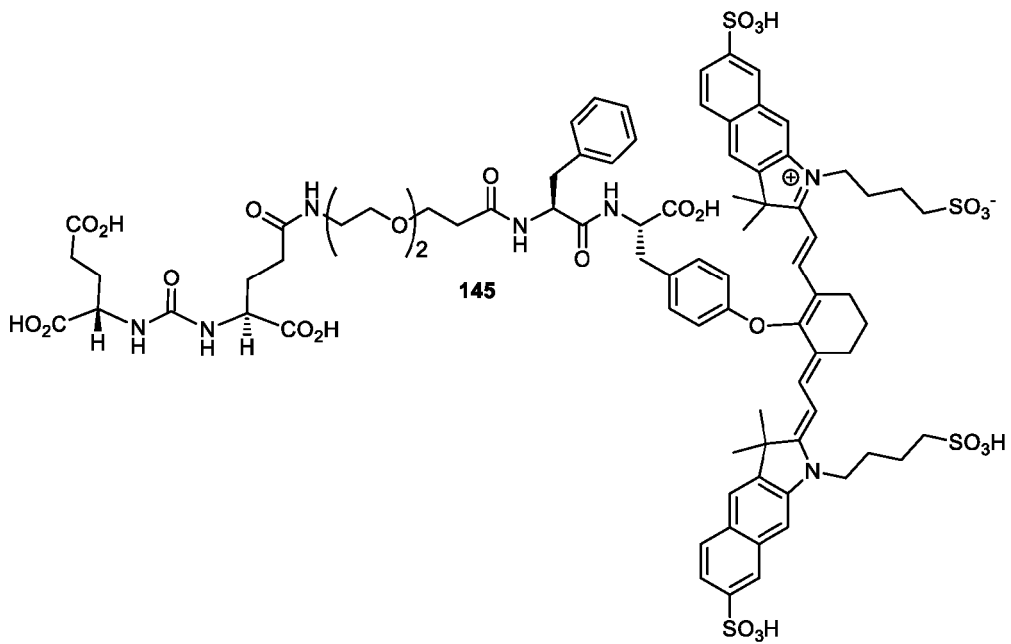
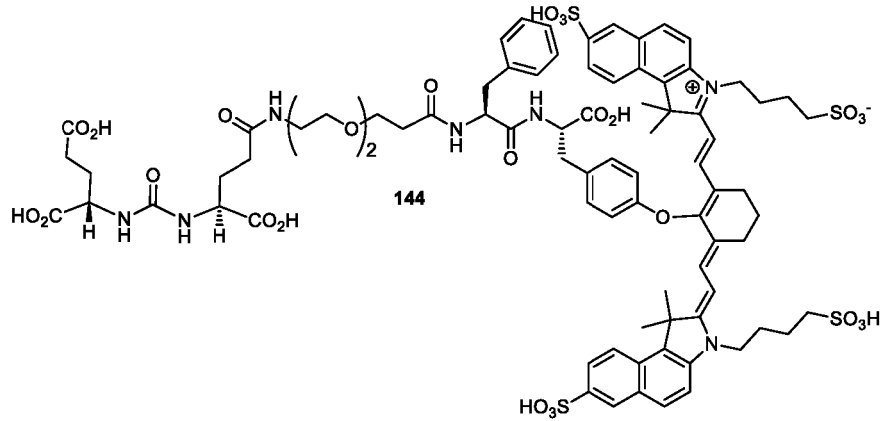
R₉ es opcional y, cuando está presente, representa una cadena carbonada lineal, o conectores de polietilenglicol, conectores de polietilenaamina, conector catiónico;

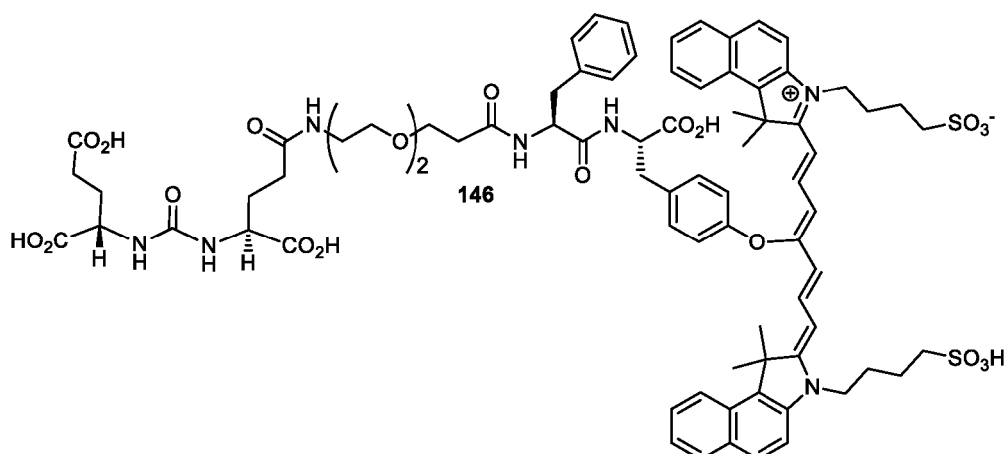
R₁₀ representa un CO₂H, PO₃H₂, SO₃H, CH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂CH₂SO₃H;

R₁₁ representa CO₂H, SO₃H, CH₂CONHCH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂CH₂SO₃H; y

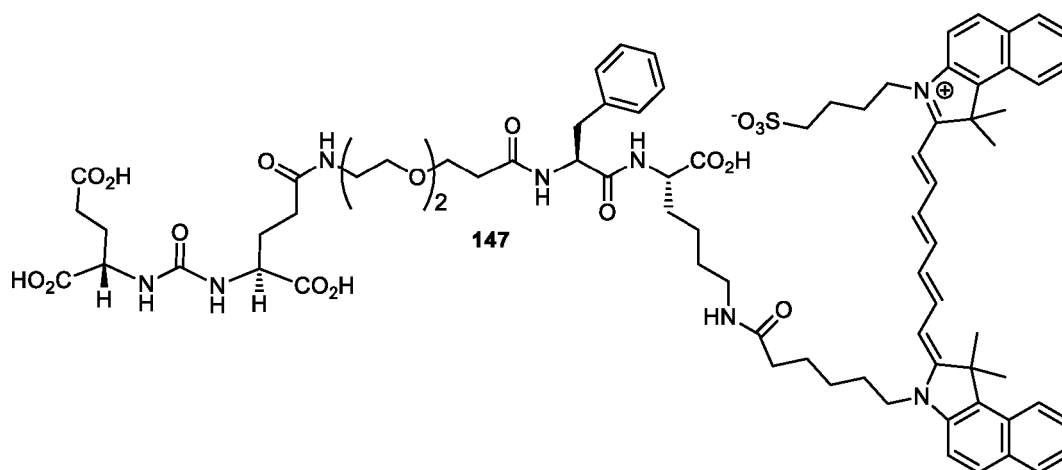
- 5 R₁₂ representa independientemente representa un hidrógeno, un grupo metilo, CH₂COOH, un CH₂ y cada uno puede representar, opcionalmente, un CH₂ que comparte un enlace.

Algunos compuestos preferidos adicionales de la invención incluyen los siguientes:





y



5

En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención tienen un máximo de absorción y de emisión entre aproximadamente 500 nm y aproximadamente 900 nm. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención tienen un máximo de absorción y de emisión entre aproximadamente 600 nm y 800 nm.

10

En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención están hechos para emitir fluorescencia después de la distribución de los mismos en las células tisulares. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención están hechos para emitir fluorescencia sometiendo a los compuestos a una luz de excitación en la longitud de onda del infrarrojo cercano. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención tienen una afinidad de unión al PSMA que es similar a la afinidad de unión del DUPA. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención son muy selectivos para dirigirse a una célula tumoral.

15

Dichos compuestos mencionados anteriormente pueden usarse para la obtención óptica de imágenes de tejido biológico que expresa el PSMA.

20

Dichos compuestos mencionados anteriormente pueden usarse para el tratamiento del cáncer. El cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, sarcoma, cáncer de mama, cáncer cerebral, carcinoma neuroendocrino, cáncer de colon, cáncer testicular o melanoma. Los compuestos de colorante del NIR dirigidos al PSMA de la presente invención pueden usarse para la obtención de imágenes de células que expresan el PSMA. Estas células pueden elegirse del grupo que consiste en células de próstata, células de cáncer de próstata, células de cáncer de vejiga, células de cáncer de páncreas, células de cáncer de hígado, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de riñón, células de sarcoma, células de cáncer de mama, células de cáncer cerebral, células de carcinoma neuroendocrino, células de cáncer de colon, células de cáncer testicular o células de melanoma;

25

30

Dichos compuestos anteriores pueden usarse para el direccionamiento a un tipo celular en una muestra biológica. Dichos compuestos anteriores pueden usarse para realizar una cirugía guiada por imagen de dichos compuestos anteriores que pueden usarse en el diagnóstico de una enfermedad en un sujeto.

35

Algunas realizaciones de la presente invención proporcionan un kit que comprende un compuesto colorante del NIR que se dirige al PSMA. En algunas realizaciones, el kit se usa para la obtención de imágenes de células o tejidos que

expresan el PSMA. En algunas realizaciones, las células que expresan el PSMA son células tumorales. En algunas realizaciones, las células que expresan el PSMA son células de un cáncer no prostático. En ciertas realizaciones, las células que expresan el PSMA son células tumorales de próstata. En ciertas realizaciones, las células que expresan el PSMA son células cancerosas. En algunas realizaciones, la presente invención se usa para la detección de una enfermedad metastásica. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención se usan para mejorar la resección quirúrgica y/o para mejorar el pronóstico. En algunas realizaciones, los compuestos de colorante del NIR dirigidos al PSMA de la presente invención tienen una relación entre el tumor y la señal de fondo mejorada.

Los compuestos de la presente invención pueden usarse para la obtención de imágenes, el diagnóstico o la detección de células de un cáncer no prostático elegidas entre el grupo que consiste en células de cáncer de vejiga, células de cáncer de páncreas, células de cáncer de hígado, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de riñón, células de sarcoma, células de cáncer de mama, células de cáncer cerebral, células de carcinoma neuroendocrino, células de cáncer de colon, células de cáncer testicular o células de melanoma. La presente divulgación se refiere a compuestos dirigidos al antígeno de membrana prostático específico (PSMA) conjugados con colorantes del infrarrojo cercano (NIR) y a su uso terapéutico y diagnóstico. Más específicamente, esta divulgación proporciona compuestos y usos para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades asociadas con células que expresan el antígeno de membrana prostático específico (PSMA), tales como las del cáncer de próstata y enfermedades relacionadas. Se ha descubierto que un compuesto dirigido al PSMA, tal como el DUPA, o la conjugación de un ligando que se dirige al PSMA con un colorante del NIR a través de un conector (L), puede ser útil en la obtención de imágenes, el diagnóstico y/o el tratamiento del cáncer de próstata y de las enfermedades relacionadas que implican poblaciones de células patógenas que expresan o que sobreexpresan el PSMA. El PSMA es una proteína de la superficie celular que se internaliza en un proceso análogo a la endocitosis observada en los receptores de la superficie celular, tales como los receptores de vitaminas. El PSMA también se expresa en la neovascularización de la mayoría de los tumores sólidos. Por consiguiente, se ha descubierto que pueden usarse ciertos conjugados que incluyen un conector con una longitud predeterminada y/o un diámetro predeterminado y/o unos grupos funcionales predeterminados a lo largo de su longitud para tratar, obtener imágenes y/o diagnosticar dichas enfermedades.

En otra realización, en el presente documento se describen composiciones farmacéuticas, donde la composición farmacéutica incluye los conjugados descritos en el presente documento. De manera ilustrativa, las composiciones farmacéuticas también incluyen uno o más portadores, diluyentes y/o excipientes.

En el presente documento se ha demostrado que dichos conjugados de colorante del NIR dirigidos al PSMA se unen a las células tumorales que expresan el PSMA de un tejido. Además, la intensidad de la fluorescencia es mayor que la intensidad observada previamente con otros colorantes del infrarrojo cercano que son dirigidos con folato a tumores positivos para el receptor de folato. Este aumento de la intensidad permite el direccionamiento y la identificación evidente de áreas más pequeñas de muestras biológicas (por ejemplo, tumores más pequeños) de un tejido que se está controlando. Además, el aumento de la intensidad de los compuestos de la presente invención proporciona la ventaja añadida de que se pueden administrar dosis/cantidades más bajas del colorante y sigue produciendo resultados significativos. Por lo tanto, los compuestos de la presente invención conducen a unas técnicas más económicas de obtención de imágenes. Además, existe la ventaja añadida de que una dosis más baja de los compuestos de la invención, en comparación con los compuestos de obtención de imágenes convencionales, minimiza la toxicidad y otros efectos secundarios que acompañan a la administración de materiales extraños a un cuerpo.

Además, la identificación de tumores pequeños dará lugar a una resección más precisa y eficaz del tumor primario para producir márgenes negativos, así como a una identificación y eliminación más precisa de los ganglios linfáticos portadores de células cancerosas metastásicas, y a la identificación de la enfermedad satélite. Cada una de estas ventajas se correlaciona positivamente con un mejor resultado clínico en el paciente que se está tratando.

Además de tirosina, también puede ser útil un conjugado dirigido al PSMA de un colorante del infrarrojo cercano con cisteína. Además, la unión directa del resto dirigido al PSMA con el colorante, o la unión del colorante con el DUPA o con el ligando dirigido al PSMA a través de un conector de amina, también produce una pérdida de intensidad de la fluorescencia por parte del conjugado, mientras que la presencia de la tirosina como resto conector entre los mismos mejora la fluorescencia del compuesto conjugado como resultado del hecho de que los compuestos de la invención basados en tirosina no necesitan un conector de amina adicional para conjugarse con el SO456, y además porque la conjugación a través del resto de fenol de la tirosina da lugar a una mejora en la fluorescencia.

Los compuestos se pueden usar con sistemas de obtención de imágenes tomográficas moleculares mediados por fluorescencia, tales como aquellos diseñados para detectar la activación de fluorescencia del infrarrojo cercano en tejidos profundos. Los compuestos proporcionan especificidad molecular y tisular, producen un contraste de fluorescencia alto, una señal de fluorescencia más brillante, y reducen la autofluorescencia de fondo, lo que permite una detección y un análisis del objetivo molecular mejorados del tejido enfermo *in vivo* (por ejemplo, cánceres). Los compuestos se pueden usar para la obtención de imágenes tridimensionales de tejido profundo, en cirugía dirigida y para cuantificar la cantidad de un tipo de célula objetivo en una muestra biológica.

Los compuestos que se dirigen al PSMA pueden seleccionarse, por ejemplo, según las siguientes criterios, que no pretenden ser excluyentes: unión a células vivas que expresan el PSMA; unión a neovascularización que expresa el PSMA;

alta afinidad de unión al PSMA; unión a un epítipo único del PSMA (para eliminar la posibilidad de que los anticuerpos con actividades complementarias, cuando se usan en combinación, compitan por la unión al mismo epítipo); opsonización de células que expresan el PSMA; mediación en la inhibición del crecimiento, fagocitosis y/o eliminación de las células que expresan el PSMA en presencia de células efectoras; modulación (inhibición o estimulación) de las actividades de la NAALADasa, la folato hidrolasa, la dipeptidil peptidasa IV y/o la γ -glutamil hidrolasa; inhibición del crecimiento, detención del ciclo celular y/o citotoxicidad en ausencia de células efectoras; internalización del PSMA; unión a un epítipo conformacional del PSMA; mínima reactividad cruzada con células o tejidos que no expresan el PSMA; y una unión preferente a las formas dimericas del PSMA en lugar de a las formas monomericas del PSMA.

Los compuestos que se dirigen al PSMA, los anticuerpos contra el PSMA y los fragmentos de unión al antígeno de los mismos proporcionados en el presente documento normalmente cumplen uno o más, y en algunos casos, más de cinco de los criterios anteriores. En algunas realizaciones, los compuestos que se dirigen al PSMA de la presente invención cumplen seis o más de los criterios anteriores. En algunas realizaciones, los compuestos que se dirigen al PSMA de la presente invención cumplen siete o más de los criterios anteriores. En algunas realizaciones, los compuestos que se dirigen al PSMA de la presente invención cumplen ocho o más de los criterios anteriores. En algunas realizaciones, los compuestos que se dirigen al PSMA de la presente invención cumplen nueve o más de los criterios anteriores. En algunas realizaciones, los compuestos que se dirigen al PSMA de la presente invención cumplen diez o más de los criterios anteriores. En algunas realizaciones, los compuestos que se dirigen al PSMA de la presente invención cumplen todos los criterios anteriores.

Algunos ejemplos de los tumores de los que pueden obtenerse imágenes con los compuestos dirigidos al PSMA de la presente invención (por ejemplo, conjugados de colorante del NIR dirigido al PSMA) proporcionados en el presente documento incluyen cualquier tumor que exprese el PSMA tal como, por ejemplo, de próstata, de vejiga, de páncreas, de pulmón, de colon, de riñón, melanomas y sarcomas. Un tumor que expresa el PSMA incluye tumores con neovasculatura que expresa el PSMA.

Las moléculas dirigidas al PSMA pueden unirse al PSMA y pueden internalizarse con el PSMA expresado en las células. Por lo tanto, un conjugado de ligando del PSMA que comprende un internalizado con el PSMA expresado en las células.

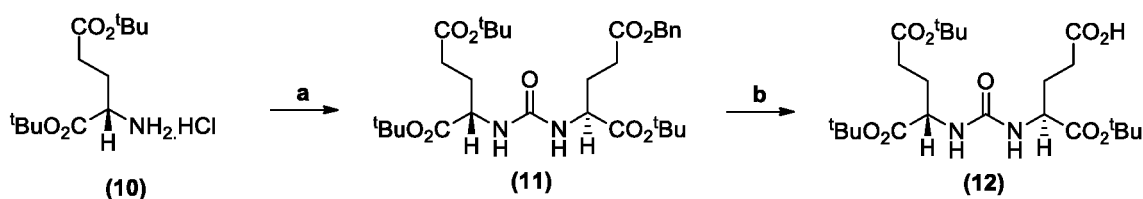
Los compuestos que se dirigen al PSMA pueden unirse a un epítipo conformacional dentro del dominio extracelular de la molécula del PSMA. Un compuesto que se dirige al PSMA puede unirse a un epítipo específico del dímero del PSMA. Generalmente, el compuesto que se une al epítipo específico del dímero se une preferentemente al dímero del PSMA más que al monómero del PSMA. El compuesto que se dirige al PSMA se une preferentemente al dímero del PSMA. El compuesto que se dirige al PSMA tiene una baja afinidad por la proteína monomérica del PSMA.

El compuesto que se dirige al PSMA puede ser un ligando. El compuesto que se dirige al PSMA es ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)ureido]pentanodioico (DUPA).

El colorante del NIR que se dirige al PSMA de la presente invención produce una relación entre el tumor y la señal de fondo que es mayor que la relación entre el tumor y la señal de fondo del compuesto que se dirige al PSMA conjugado con un colorante que no es del NIR o un colorante del NIR no dirigido. En algunas realizaciones, la mejora es de 10 veces. En algunas realizaciones, la relación entre el tumor y la señal de fondo mejora al menos a 4 veces. En algunas realizaciones, la relación entre el tumor y la señal de fondo aumenta al menos 1,5 veces. En algunas realizaciones, la señal de fondo del colorante del NIR dirigido al PSMA es la mitad de la señal de fondo del compuesto dirigido al PSMA conjugado con un colorante fluorescente reactivo a la luz de menos de 600 nm de longitud de onda.

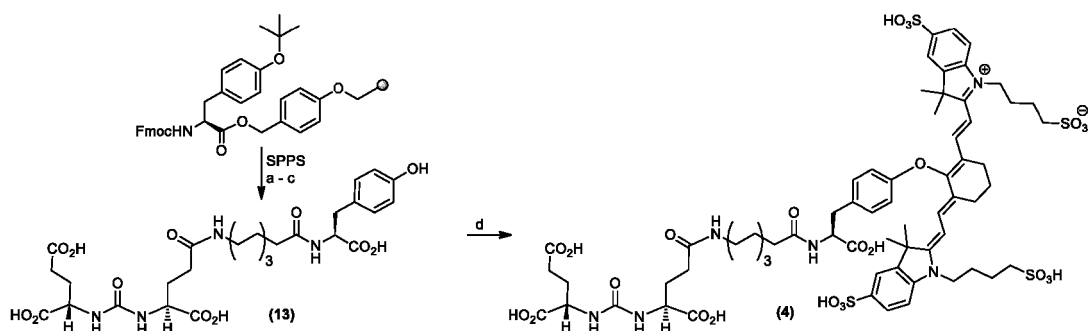
Conjugados de colorantes del NIR dirigidos al PSMA y su síntesis

Los siguientes esquemas muestran la síntesis de los conjugados de colorante del NIR dirigidos al PSMA de la presente invención.



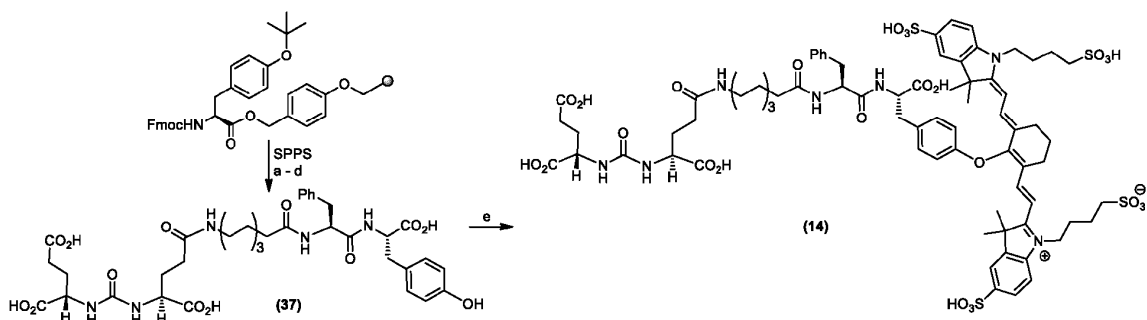
Esquema 1: Reactivos y condiciones: (a) (i) trifosgeno, TEA/DCM, -78 °C; (ii) H-L-Glu(OBn)-O^tBu • HCl; (b) H₂; Pd/C/DCM

55



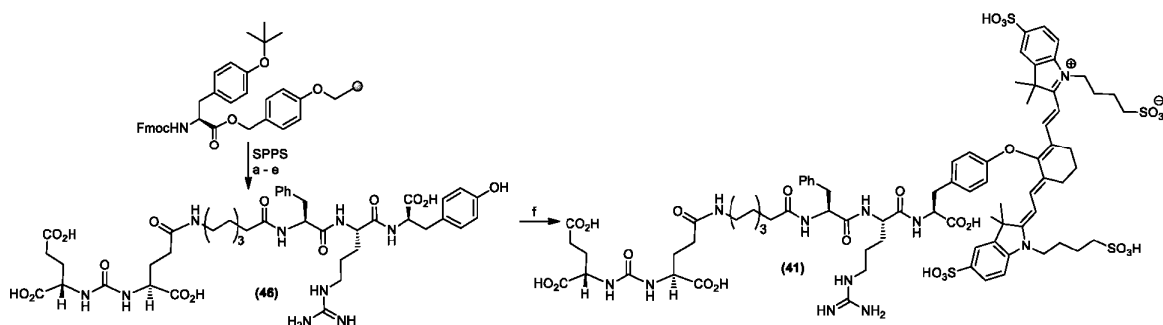
Esquema 2: Reactivos y condiciones: (a) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; (ii) Fmoc-ácido Eightaminooctanoic-OH, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; b) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; (ii) **12**, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; c) TFA:H₂O:TIPS (95:2,5:2,5), 1 h; (d) (i) H₂O, NaOH acuoso/pH = 9,5, t.a.; (ii) S0456, H₂O, 100 °C, 15 min.

(a)

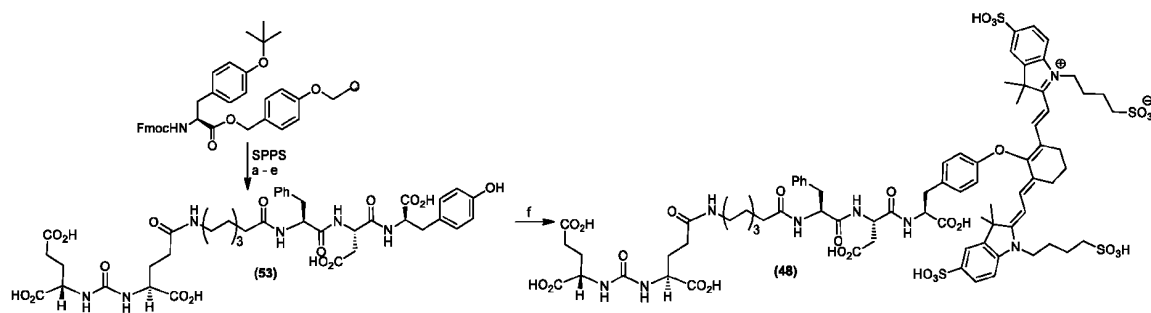


Esquema 3: Reactivos y condiciones: (a) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; (ii) Fmoc-Phe-OH, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (b) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; (ii) Fmoc-ácido Eightaminooctanoic-OH, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (c) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; (ii) **12**, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (d) TFA:H₂O:TIPS (95:2,5:2,5), 1 h; (e) (i) H₂O, NaOH acuoso/pH = 9,5, t.a.; (ii) S0456, H₂O, 100 °C, 15 min.

(a)



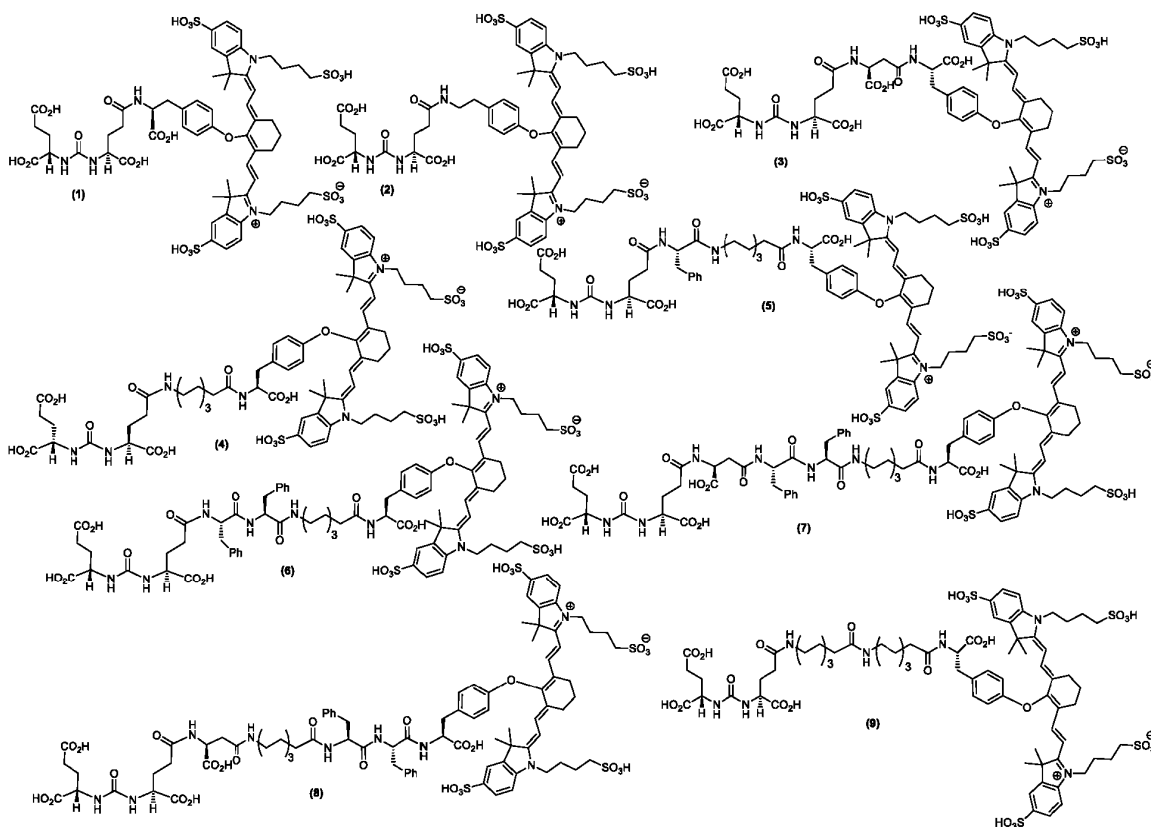
Esquema 4: Reactivos y condiciones: (a) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; Fmoc-Arg(Pbf)-OH, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (b) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; (ii) Fmoc-Phe-OH, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (c) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; (ii) Fmoc-ácido Eightaminooctanoic-OH, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (d) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; **12**, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (e) TFA:H₂O:TIPS (95:2,5:2,5), 1 h; (f) (i) H₂O, NaOH acuoso/pH = 9,5, t.a.; (ii) S0456, H₂O, 100 °C, 15 min.



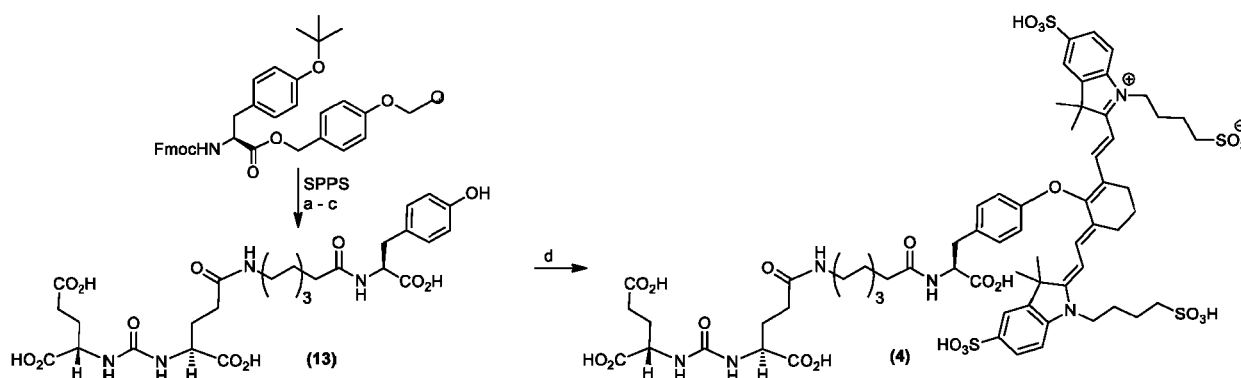
Esquema 5: Reactivos y condiciones: (a) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; (ii) Fmoc-Asp(O^tBu)-OH, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (b) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; (ii) Fmoc-Phe-OH, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (c) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; (ii) Fmoc-ácido Eightaminooctanoic-OH, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (d) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; **12**, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (e) TFA:H₂O:TIPS (95:2,5:2,5), 1 h; (f) (i) H₂O, NaOH acuoso/pH = 9,5, t.a.; (ii) S0456, H₂O, 100 °C, 15 min.

Ejemplos

Ejemplo (1): Evaluación preclínica de los conjugados de colorante del NIR dirigido al PSMA con una variación aleatoria en la longitud del conector/separador entre el ligando y el colorante del NIR



Esquema 1: Reactivos y condiciones: (a) (i) trifosgeno, TEA/DCM, -78 °C; (ii) H-L-Glu(OBn)-O^tBu • HCl; (b) H₂; Pd/C/DCM



Esquema 2: Reactivos y condiciones: (a) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; (ii) Fmoc-ácido Eightaminooctanoico-OH, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; b) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; (ii) **12**, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; c) TFA:H₂O:TIPS (95:2,5:2,5), 1 h; (d) (i) H₂O, NaOH acuoso/pH = 9,5, t.a.; (ii) S0456, H₂O, 100 °C, 15 min.

(a) Estudios *in vitro*.

La **figura 2** muestra la estructura del conjugado de DUPA-FITC (isotiocianato de fluoresceína) (**14**) dirigido al PSMA y su afinidad de unión (K_D) y especificidad sobre células de cáncer de próstata humano 22Rv1 positivas para el PSMA y sobre células de epitelio basal alveolar humano A549 negativas para el PSMA en cultivo. Se añadió DUPA-FITC disuelto en medio RPMI en las concentraciones indicadas a las células 22Rv1 o A549 en medio de cultivo RPMI y se dejaron en incubación durante 1 h a 37 °C. Después se retiró el medio, se lavó con medio reciente (3x) y se substituyó por PBS (solución salina tamponada con fosfato). Las muestras se analizaron usando citometría de flujo. Las barras de error representan la DE (n = 3). ** no se une a las células A549

Figura 3 Afinidades de unión relativas de los conjugados de DUPA-NIR **1-9** con respecto al DUPA-FITC (**14**). Se incubaron células de cáncer de próstata humano 22Rv1 positivas para el PSMA durante 1 h a 37 °C en presencia de DUPA-FITC 100 nM con concentraciones crecientes de los conjugados de DUPA-NIR. Después se retiró el medio, se lavó con medio reciente (3x) y se substituyó por PBS. La fluorescencia unida a la célula se analizó usando citometría de flujo.

Se controló la afinidad de unión de los conjugados de DUPA-NIR y los datos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Afinidad de unión de los conjugados de DUPA-NIR con separadores de longitud variable por células de cáncer de próstata humano 22Rv1 positivas para el PSMA.

Compuesto	Numero de átomos entre el DUPA y el agente del NIR	K_D (nM)
1	3	141,9
2	3	112,7
3	7	9,71
4	12	15,2
5	15	12,2
6	18	35,7
7	22	26,8
8	22	23,2
9	21	17,2

Estudios *in vivo*. Para el análisis *in vivo*, se controló la distribución tisular de los conjugados de DUPA-NIR, y se muestra en la figura 4. Más específicamente, se controló la biodistribución de los conjugados de DUPA-NIR **1-9** usando la obtención de imágenes de fluorescencia de ratones portadores de xenoinjertos de tumor de próstata humano (células 22Rv1). A ratones atímicos macho con xenoinjertos de tumor 22Rv1 se les inyectaron conjugados de DUPA-colorante del NIR a través de la vena de la cola. Los ratones se sacrificaron 2 h después de la administración del conjugado de DUPA-colorante del NIR, se recogieron los tejidos seleccionados y se obtuvieron imágenes de los tejidos con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s). Los resultados se muestran en la figura 4.

También se analizaron los conjugados para mostrar la relación entre la fluorescencia del tumor y del tejido. La figura 5 muestra la relación entre la fluorescencia del tumor y del tejido de los datos de la biodistribución tisular de los conjugados de DUPA-NIR **1-9** dirigidos al PSMA. Tras la obtención de las imágenes, se midió la fluorescencia en una región de interés (ROI) en cada tejido usando un programa informático de obtención de imágenes *in vivo* y después

se calculó la fluorescencia entre el tumor y el tejido

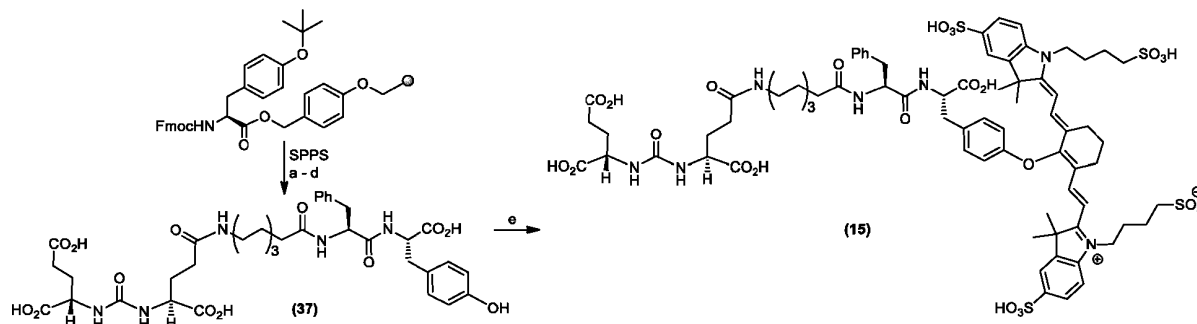
Conclusión: Los datos de la afinidad de unión *in vitro* mostraron que los compuestos 3 (separador de 7 átomos), 4 (separador de 12 átomos) y 5 (separador de 15 átomos) tienen una afinidad muy alta por el PSMA, mientras que los compuestos 1 (separador de 3 átomos) y 2 (separador de 3 átomos) tienen una baja afinidad por el PSMA. Los datos anteriores demuestran que el colorante del NIR dirigido al PSMA requiere una longitud mínima de un separador de 7 átomos entre el DUPA y el agente del NIR para tener una afinidad de unión eficaz óptima.

El compuesto 4, DUPA-EAOA-Tyr-S0456, el (EAOA - ácido Eight aminooctoico) mostró la mejor relación entre el tumor y la señal de fondo (TBR) de todos los compuestos evaluados. El compuesto 4 también mostró una mayor intensidad de fluorescencia en el tumor. Los compuestos 6 y 7 mostraron la segunda y la tercera mejor TBR entre los compuestos evaluados en este ejemplo. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia en el tumor para el compuesto 6 y 7 era menor en comparación con la del compuesto 3, 4 y 5. Después de considerar la afinidad y la especificidad por las células de cáncer de próstata y los tejidos tumorales que expresan el PSMA, la intensidad de fluorescencia en el tumor, la relación entre el tumor y la señal de fondo, etc., parece ser que el compuesto 4 puede considerarse un candidato clínico adecuado, aunque los otros compuestos también pueden proporcionar algunos conocimientos valiosos en clínica, así como en condiciones experimentales.

Ejemplo 2: Evaluación preclínica de los conjugados del NIR dirigidos al PSMA con conectores aminoácidos aromáticos entre el ligando y el colorante del NIR.

La figura 6 muestra las estructuras de los agentes de obtención de imágenes dirigidos al PSMA DUPA-conector-NIR con conectores aminoácidos aromáticos entre el ligando y el colorante del NIR. El esquema sintético se muestra en el esquema 3.

(b) Síntesis



Esquema 3: Reactivos y condiciones: (a) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; (ii) Fmoc-Phe-OH, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (b) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; (ii) Fmoc-ácido Eightaminooctoico-OH, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (c) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; (ii) 12, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; d) TFA:H₂O:TIPS (95:2,5:2,5), 1 h; (e) (i) H₂O, NaOH acuoso/pH = 9,5, t.a.; (ii) S0456, H₂O, 100 °C, 15 min.

Estudios *in vitro*. La figura 7 muestra las afinidades de unión relativas de los conjugados de DUPA-NIR con conectores aminoácidos aromáticos con respecto a DUPA-FITC (14). Se incubaron células de cáncer de próstata humano 22Rv1 positivas para el PSMA durante 1 h a 37 °C en presencia de DUPA-FITC 100 nM con concentraciones crecientes de los conjugados de DUPA-NIR. Después se retiró el medio, se lavó con medio reciente (3x) y se substituyó por PBS. La fluorescencia unida a la célula se analizó usando citometría de flujo.

La **Tabla 2** muestra los datos de la afinidad de unión de los conjugados de DUPA-NIR con conectores aromáticos a las células de cáncer de próstata humano 22Rv1 positivas para el PSMA.

Compuesto	KD (nM)
15	4,9
23	7,5
25	6,3
27	22,2
32	32
33	16
34	34,9
35	23,9
36	13,4

Estudios *in vivo*. La figura 8 muestra el análisis de biodistribución tisular y relación entre el tumor y el tejido de los

conjugados de DUPA-NIR **15** y **23** usando la obtención de imágenes de fluorescencia de ratones portadores de xenoinjertos de tumor de próstata humano (células 22Rv1). A ratones atímicos macho con xenoinjertos de tumor 22Rv1 se les inyectaron conjugados de DUPA-colorante del NIR a través de la vena de la cola. Los ratones se sacrificaron 2 h después de la administración del conjugado de DUPA-colorante del NIR, se recogieron los tejidos seleccionados y se obtuvieron imágenes de los tejidos con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s). Tras la obtención de las imágenes, se midió la fluorescencia en una región de interés (ROI) en cada tejido usando un programa informático de obtención de imágenes *in vivo* y después se calculó la fluorescencia entre el tumor y el tejido.

La figura 9 muestra una superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 20 nmol de **15** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

La figura 10 muestra una superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv 1 se le inyectaron 20 nmol de **23** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

La figura 11 muestra una superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 20 nmol de **25** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

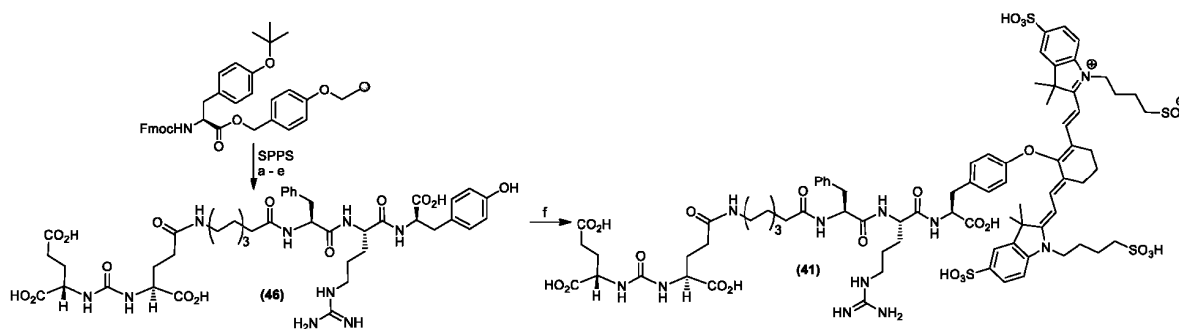
La figura 12 muestra una superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv 1 se le inyectaron 6 nmol de **35** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

La figura 13 muestra una superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 6 nmol de **36** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

Conclusión: Estos datos de afinidad de unión *in vitro* demostraron que los compuestos 15, 23, 25 y 36 tienen una afinidad muy alta por el PSMA. Además, los compuestos 15, 23, 25, 35 y 36 mostraron unos datos muy buenos de obtención de imágenes de cuerpo completo a las 2-4 horas de su administración al animal. Además, los compuestos 15 y 35 mostraron una excelente relación entre el tumor y la señal de fondo (TBR). Después de considerar la afinidad y la especificidad por las células de cáncer de próstata y los tejidos tumorales que expresan el PSMA, la intensidad de fluorescencia en el tumor, la relación entre el tumor y la señal de fondo, la facilidad de síntesis y la disponibilidad de las materias primas por su bajo coste, puede considerarse que el compuesto 15 y 35 son unos candidatos clínicos excelentes, aunque los otros compuestos también pueden ser útiles como candidatos tanto clínicos como experimentales.

Ejemplo (3): Evaluación preclínica de los conjugados del NIR dirigidos al PSMA con un conector de carga positiva entre el ligando y el colorante del NIR

La figura 14 muestra las estructuras de los agentes de obtención de imágenes DUPA-conector-NIR con conectores de carga positiva entre el ligando y el colorante del NIR dirigidos al PSMA, y el esquema sintético de estos agentes se muestra en el esquema 4:



Esquema 4: Reactivos y condiciones: (a) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; Fmoc-Arg(Pbf)-OH, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (b) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; (ii) Fmoc-Phe-OH, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (c) (i)

piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; (ii) Fmoc-ácido Eightaminooctanoic-OH, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (d) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; **12**, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (e) TFA:H₂O:TIPS (95:2,5:2,5), 1 h; (f) (i) H₂O, NaOH acuoso/pH = 9,5, t.a.; (ii) S0456, H₂O, 100 °C, 15 min.

5 La figura 15 muestra las afinidades de unión relativas de los conjugados de DUPA-NIR con respecto a DUPA-FITC (14). Se incubaron células de cáncer de próstata humano 22Rv1 positivas para el PSMA durante 1 h a 37 °C en presencia de DUPA-FITC 100 nM con concentraciones crecientes de los conjugados de DUPA-NIR. Después se retiró el medio, se lavó con medio reciente (3x) y se substituyó por PBS. La fluorescencia unida a la célula se analizó usando citometría de flujo.

10 **Estudios *in vivo*:** La figura 16 muestra la relación entre el tumor y el tejido de los conjugados de DUPA-NIR **39 y 41** usando la obtención de imágenes de fluorescencia de ratones portadores de xenoinjertos de tumor de próstata humano (células 22 Rv1). A ratones atímicos macho con xenoinjertos de tumor 22Rv1 se les inyectaron conjugados de DUPA-colorante del NIR a través de la vena de la cola. Los ratones se sacrificaron 2 h después de la administración del conjugado de DUPA-colorante del NIR, se recogieron los tejidos seleccionados y se obtuvieron imágenes de los tejidos con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s). Tras la obtención de las imágenes, se midió la fluorescencia en una región de interés (ROI) en cada tejido usando un programa informático de obtención de imágenes *in vivo* y después se calculó la fluorescencia entre el tumor y el tejido.

20 La figura 17 muestra una superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv 1 se le inyectaron 20 nmol de **39** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

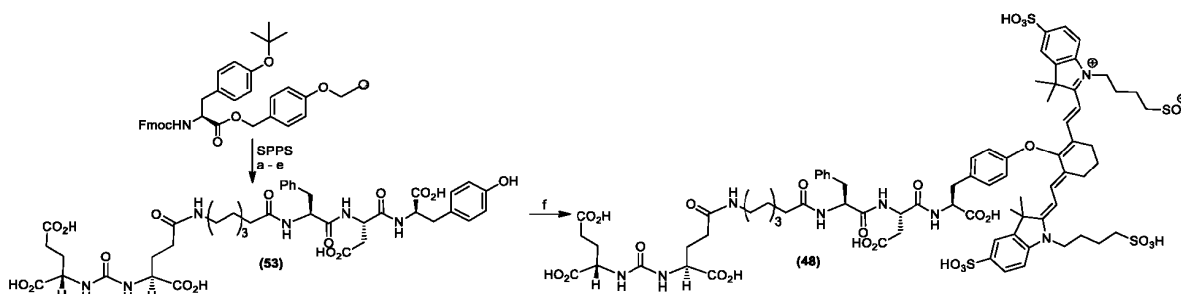
25 La figura 18 muestra y superpone la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 20 nmol de **40** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

30 La figura 19 muestra una superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv 1 se le inyectaron 20 nmol de **41** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

35 **Conclusión:** Estos datos de afinidad de unión *in vitro* demostraron que el compuesto 41 tiene una afinidad muy alta por el PSMA. Los compuestos 39, 40 y 41 mostraron una obtención de imágenes de cuerpo completo muy buena y una rápida eliminación de la piel en estudios de obtención de imágenes dependientes del tiempo. La adición de Arg al conector entre el conector ligando-ácido eight aminooctanoic y colorante del NIR aumentó el número de cargas positivas y disminuyó la carga negativa total de la molécula global. A pesar de tener Arg, los restos disminuyeron la afinidad de la molécula por el PSMA, estos compuestos mostraron una rápida eliminación de la piel. Después de considerar la afinidad y la especificidad por las células de cáncer de próstata y los tejidos tumorales que expresan el PSMA, la rápida eliminación de la piel, el compuesto **41** puede considerarse un candidato clínico, aunque los otros compuestos también pueden ser útiles como candidatos tanto clínicos como experimentales.

45 **Ejemplo (4):** Evaluación preclínica de los conjugados del NIR dirigidos al PSMA con un conector de carga negativa entre el ligando y el colorante del NIR.

50 La figura 20 muestra las estructuras de los agentes de obtención de imágenes DUPA-conector-NIR dirigidos al PSMA con conectores de carga negativa entre el ligando y el colorante del NIR. El esquema sintético se muestra en el esquema 5.



55 **Esquema 5:** Reactivos y condiciones: (a) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; (ii) Fmoc-Asp(O^tBu)-OH, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (b) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; (ii) Fmoc-Phe-OH, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (c) (i)

piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; (ii) Fmoc-ácido Eightaminooctanoic-OH, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (d) (i) piperidina al 20 %/DMF, t.a., 10 min; **12**, HATU, DMF/DIPEA, 2 h; (e) TFA:H₂O:TIPS (95:2,5:2,5), 1 h; (f) (i) H₂O, NaOH acuoso/pH = 9,5, t.a.; (ii) S0456, H₂O, 100 °C, 15 min.

5 Estudios *in vitro*: Figura 21 Afinidades de unión relativas de los conjugados de DUPA-NIR de **49** y **50** con respecto a DUPA-FITC (**14**). Se incubaron células de cáncer de próstata humano 22Rv1 positivas para el PSMA durante 1 h a 37 °C en presencia de DUPA-FITC 100 nM con concentraciones crecientes de los conjugados de DUPA-NIR. Después se retiró el medio, se lavó con medio reciente (3x) y se sustituyó por PBS. La fluorescencia unida a la célula se analizó usando citometría de flujo.

10 Estudios *in vivo*. La figura 22 muestra el análisis de biodistribución tisular y relación entre el tumor y el tejido de los conjugados de DUPA-NIR **49** y **50** usando la obtención de imágenes de fluorescencia de ratones portadores de xenoinjertos de tumor de próstata humano (células 22Rv1). A ratones atímicos macho con xenoinjertos de tumor 22Rv1 se les inyectaron conjugados de DUPA-colorante del NIR a través de la vena de la cola. Los ratones se sacrificaron 2 h después de la administración del conjugado de DUPA-colorante del NIR, se recogieron los tejidos seleccionados y se obtuvieron imágenes de los tejidos con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s). Tras la obtención de las imágenes, se midió la fluorescencia en una región de interés (ROI) en cada tejido usando un programa informático de obtención de imágenes *in vivo* y después se calculó la fluorescencia entre el tumor y el tejido.

20 Conclusión: Aunque tenía una baja afinidad de unión por el PSMA, el compuesto 49 tiene una acumulación en el tumor muy alta (alta intensidad de fluorescencia) y una buena relación entre el tumor y la señal de fondo

Ejemplo (5): Evaluación preclínica de los conjugados de colorante del NIR dirigidos al PSMA con una variación de la carga de la molécula del colorante del NIR.

25 La figura 23 muestra las estructuras de los agentes de obtención de imágenes DUPA-conector-NIR dirigidos al PSMA con una molécula de colorante del NIR con carga variable.

30 **Figura 24:** Afinidades de unión relativas de los conjugados de DUPA-NIR con respecto a DUPA-FITC (**14**). Se incubaron células de cáncer de próstata humano 22Rv1 positivas para el PSMA durante 1 h a 37 °C en presencia de DUPA-FITC 100 nM con concentraciones crecientes de los conjugados de DUPA-NIR. Después se retiró el medio, se lavó con medio reciente (3x) y se sustituyó por PBS. La fluorescencia unida a la célula se analizó usando citometría de flujo.

Compuesto	K _D (nM)
15	4,9
54	2,6
55	7,3
56	3,7
59	60,9
60	5,4

35 **Figura 25:** Superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 20 nmol de **54** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

40 La figura 26 muestra la superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv 1 se le inyectaron 20 nmol de **55** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

45 La figura 27 muestra la superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 20 nmol de **56** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

50 La figura 28 muestra la superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv 1 se le inyectaron 20 nmol de **57** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo

55 La figura 29 muestra la superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv 1 se le inyectaron 20 nmol de **58** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. =

ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo

La figura 30 muestra la superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv 1 se le inyectaron 20 nmol de **60** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

Conclusión: Estos datos de afinidad de unión *in vitro* demostraron que los compuestos 15, 55, 56 y 60 tienen una afinidad muy alta por el PSMA. Los compuestos 15, 54, 57 y 60 mostraron una obtención de imágenes de cuerpo completo muy buena y una rápida eliminación de la piel en estudios de obtención de imágenes dependientes del tiempo. Por lo tanto, la reducción de la carga negativa mediante la eliminación de los grupos ácido sulfónico (SO₃H) del colorante del NIR ayudó a producir una rápida eliminación de la piel y una acumulación rápida en el tumor. Después de considerar la afinidad y la especificidad por las células de cáncer de próstata y los tejidos tumorales que expresan el PSMA, la rápida eliminación de la piel, los compuestos 54, 57 y 60 pueden considerarse candidatos clínicos.

Ejemplo (6): Evaluación preclínica de los conjugados de colorante del NIR dirigido al PSMA: Diversos conjugados de DUPA-NIR

Figura 31: Estructuras de los agentes de obtención de imágenes DUPA-conector-NIR dirigidos al PSMA con diversos conectores y colorantes del NIR.

La **figura 32** muestra las afinidades de unión relativas de los conjugados de DUPA-NIR con respecto a DUPA-FITC (14). Se incubaron células de cáncer de próstata humano 22Rv1 positivas para el PSMA durante 1 h a 37 °C en presencia de DUPA-FITC 100 nM con concentraciones crecientes de los conjugados de DUPA-NIR. Después se retiró el medio, se lavó con medio reciente (3x) y se sustituyó por PBS. La fluorescencia unida a la célula se analizó usando citometría de flujo

Compuesto	K _D (nM)
62	141,4
64	318,8
65	983
66	No activo

Estudios *in vivo*. La figura 33 muestra la superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv1 se le inyectaron 20 nmol de **63** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

La **figura 34** muestra la superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv 1 se le inyectaron 6 nmol de **63** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

La **figura 35** muestra la superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv 1 se le inyectaron 20 nmol de **64** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

Conclusión: Estos datos de afinidad de unión *in vitro* demostraron que los compuestos 62, 64, 65 y 66 tienen una baja afinidad por el PSMA. Sin embargo, los compuestos 63 y 64 también mostraron una obtención de imágenes de cuerpo completo muy buena y una rápida eliminación de la piel en estudios de obtención de imágenes dependientes del tiempo. Por lo tanto, los compuestos 63 y 64 pueden considerarse unos candidatos clínicos particularmente preferidos, aunque los otros compuestos también pueden ser útiles como candidatos tanto clínicos como experimentales.

Ejemplo (7): Evaluación preclínica de los conjugados de colorante del NIR dirigido al PSMA: Ligandos alternativos del DUPA

La figura 36 muestra las estructuras de los agentes de obtención de imágenes del NIR dirigidos al PSMA con un ligando diferente.

La figura 37 muestra las afinidades de unión relativas de los conjugados del NIR dirigidos al PSMA 15 con respecto a DUPA-FITC (14) para células 22Rv1 positivas para el PSMA y para A549 negativas para el PSMA. Las células cancerosas se incubaron durante 1 h a 37 °C en presencia de DUPA-FITC 100 nM con concentraciones crecientes del compuesto 15. Después se retiró el medio, se lavó con medio reciente (3x) y se sustituyó por PBS. La fluorescencia unida a la célula se analizó usando citometría de flujo.

La figura 38 muestra la superposición de la imagen de fluorescencia de la totalidad del cuerpo o de la mitad del cuerpo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de un xenoinjerto de tumor de próstata humano 22Rv 1 se le inyectaron 6 nmol de **15** y se obtuvieron imágenes con un aparato IVIS (ex. = 745 nm, em. = ICG, tiempo de exposición = 1 s) en diferentes intervalos de tiempo.

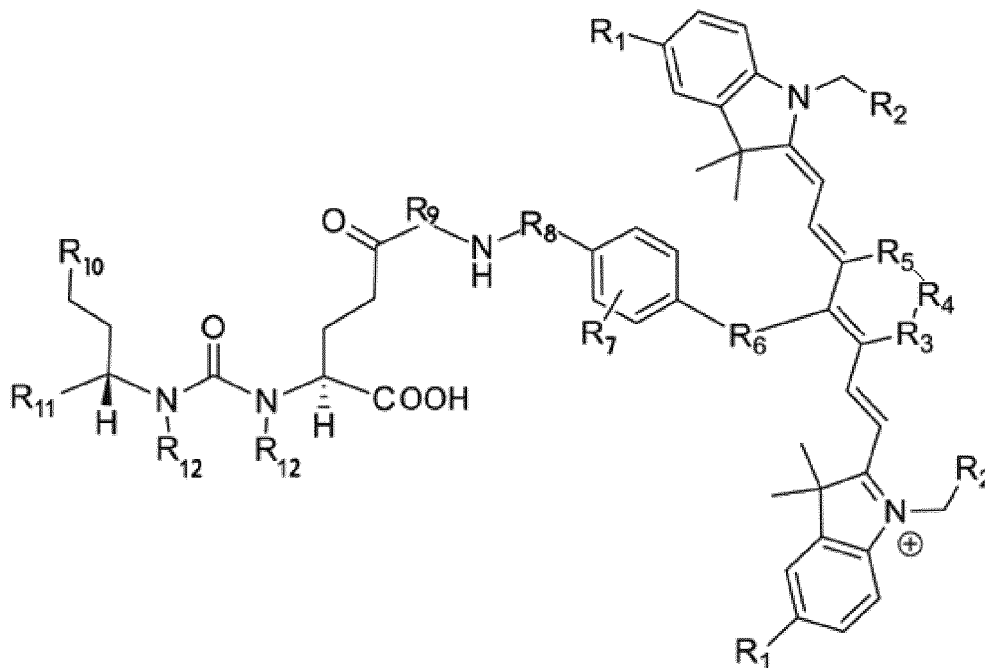
5

Conclusión: Aunque se han sintetizado ligandos alternativos del DUPA que tienen una mayor afinidad por el PSMA cuando se comparan con el DUPA, este ejemplo muestra que el compuesto 15 tiene una afinidad muy alta por las células 22Rv1 positivas para el PSMA, pero no por las células A549 negativas para el PSMA, lo que indica que el compuesto 15 es muy específico para el PSMA. Los estudios de obtención de imágenes de cuerpo completo dependientes del tiempo demostraron que el compuesto 15 se acumulaba en los tumores positivos para el PSMA y en los riñones del ratón, demostrando de nuevo que el compuesto 15 es un excelente candidato clínico.

10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula estructural:



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R₁ representa un hidrógeno o SO₃H;

R₂ representa un hidrógeno o CH₃ o C₃H₆SO₃⁻ o C₃H₆SO₃H o C₄H₈SO₃⁻ o C₄H₈SO₃H o C₃H₆N⁺(CH₃)₃;

10 R₃, y R₅ representan cada uno un carbono, opcionalmente uno o más enlaces compartidos, u oxígeno o azufre, o nitrógeno

R₄ representa un carbono opcionalmente con uno o más enlaces compartidos;

R₆ representa nitrógeno, oxígeno o azufre o ningún átomo (enlace directo C-C entre el anillo aromático y el anillo de vinilo);

15 R₇ es opcional y, cuando está presente, representa un grupo sustituyente aromático donante de electrones;

R₈ es opcional y, cuando está presente, representa conectores con aminoácidos aromáticos tales como Phe, Trp, His, Tyr, y/o aminoácidos catiónicos como Arg, Lys, y/o aminoácidos aniónicos tales como Asp, Glu, y/o aminoácidos no naturales de ácidos aromáticos/catiónicos/aniónicos;

20 R₉ es opcional y, cuando está presente, representa una cadena carbonada lineal, o conectores de polietilenglicol, conectores de polietilendiamina o un conector catiónico;

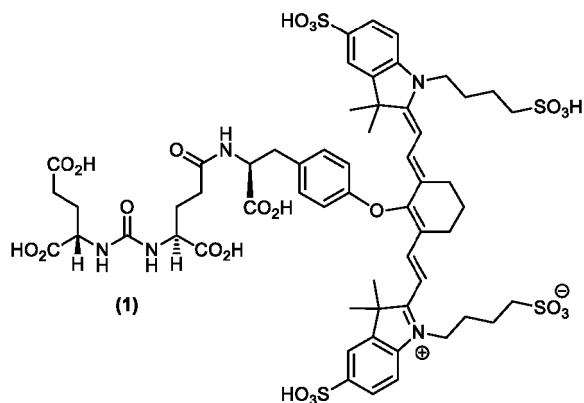
R₁₀ representa un CO₂H, PO₃H₂, SO₃H, CH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂CH₂SO₃H;

R₁₁ representa CO₂H, SO₃H, CH₂CONHCH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂CH₂SO₃H; y

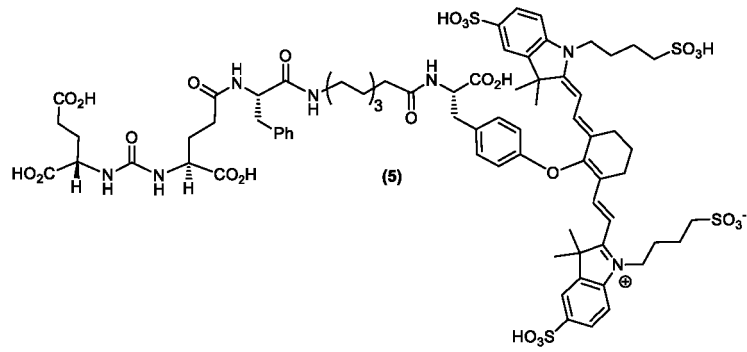
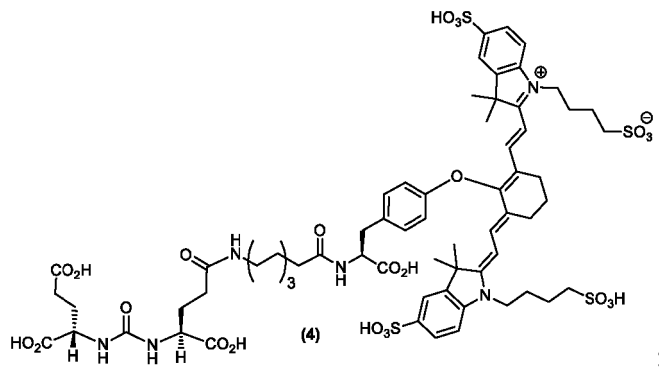
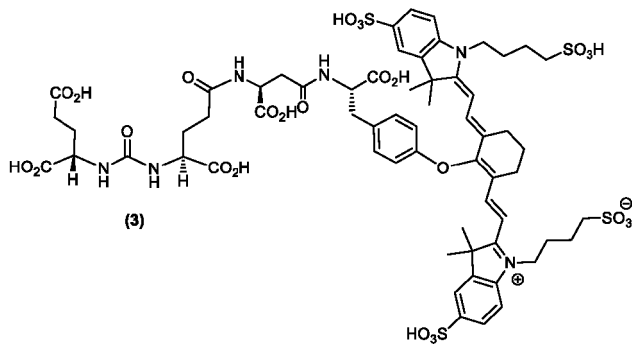
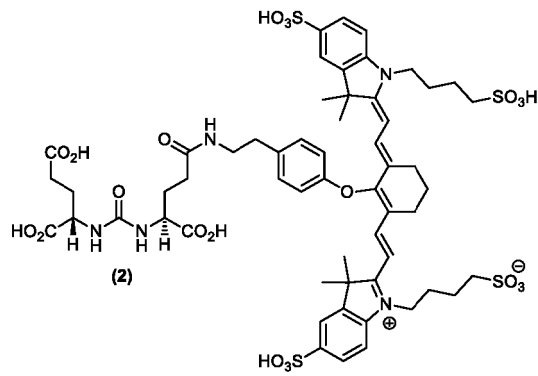
R₁₂ representa independientemente representa un hidrógeno, un grupo metilo, CH₂COOH, un CH₂ y cada uno puede representar, opcionalmente, un CH₂ que comparte un enlace.

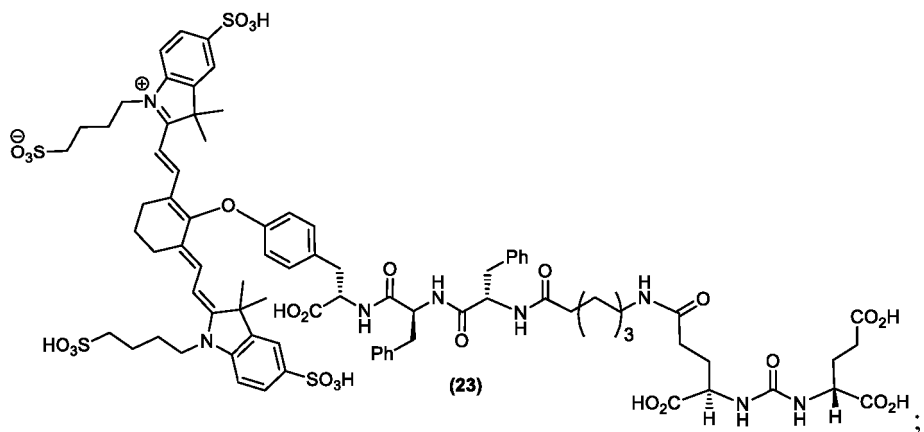
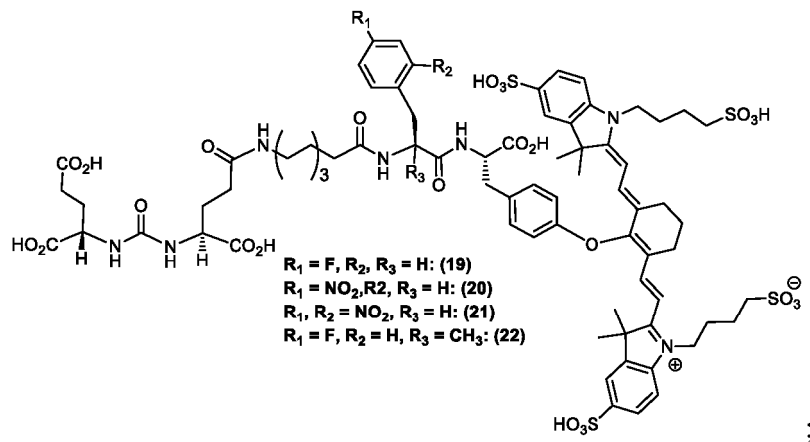
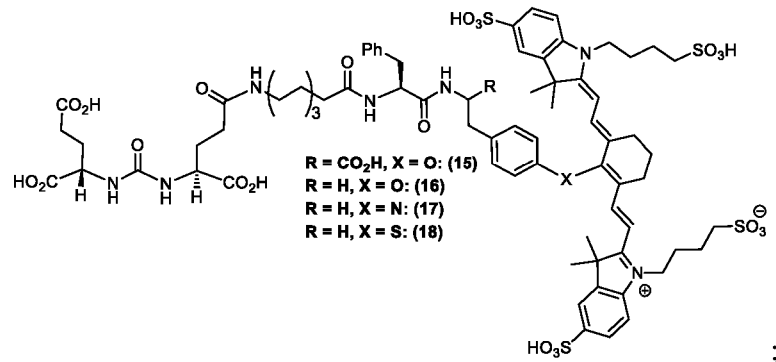
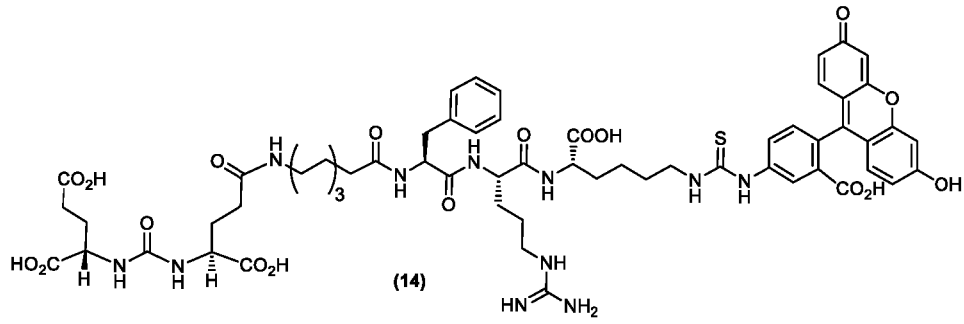
25

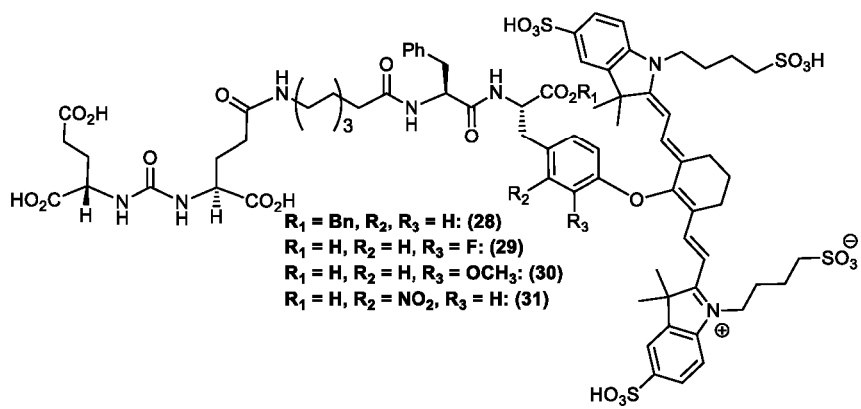
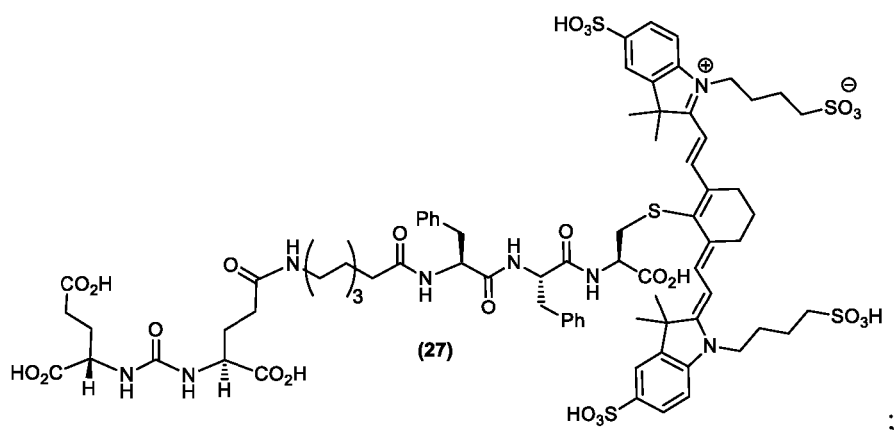
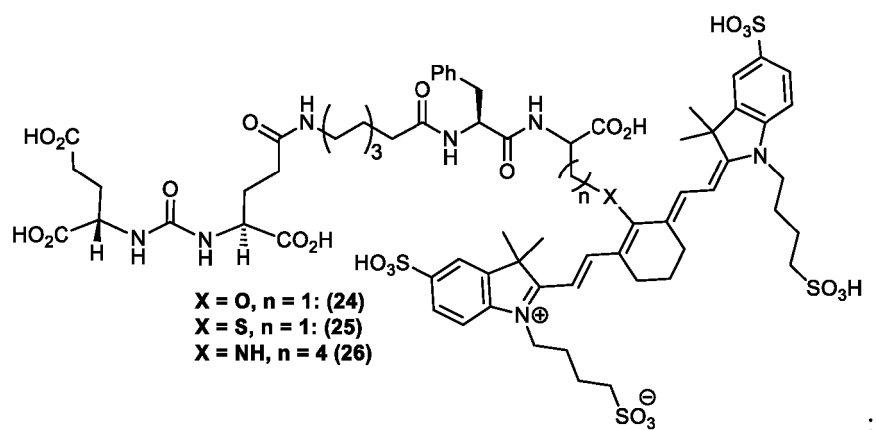
2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

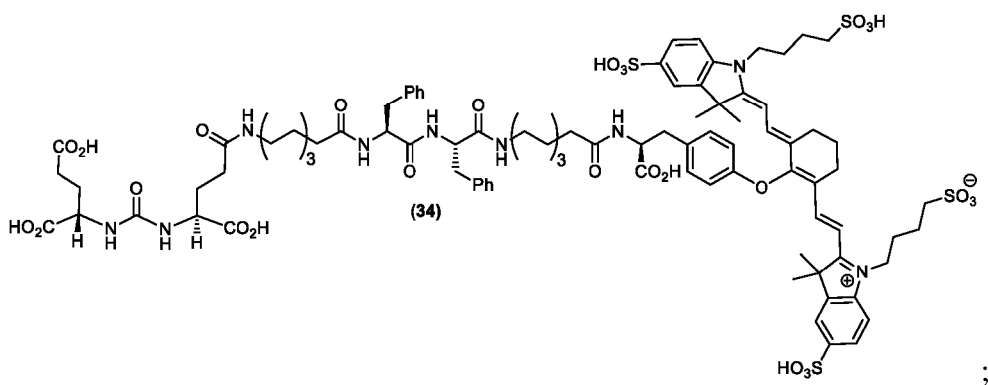
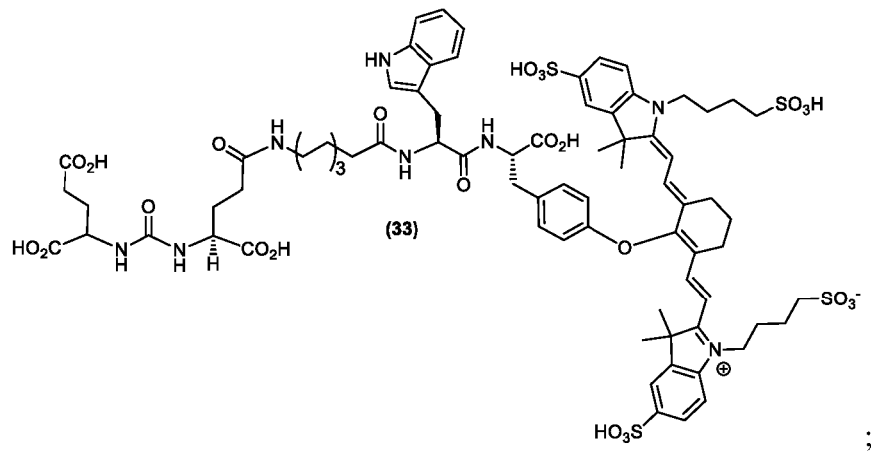
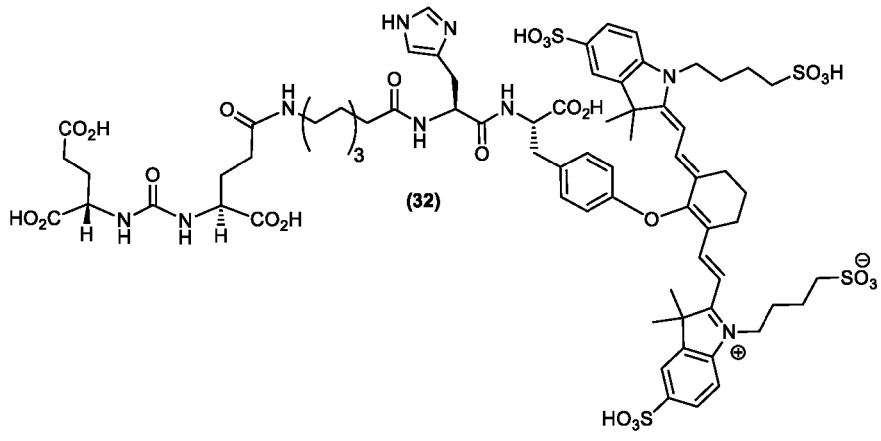


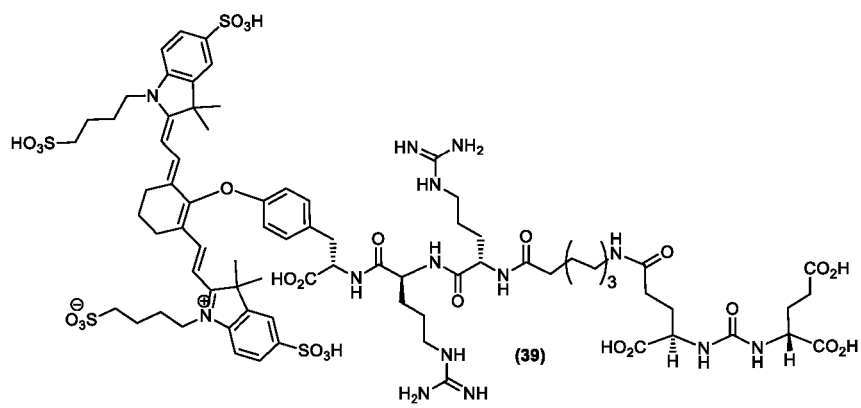
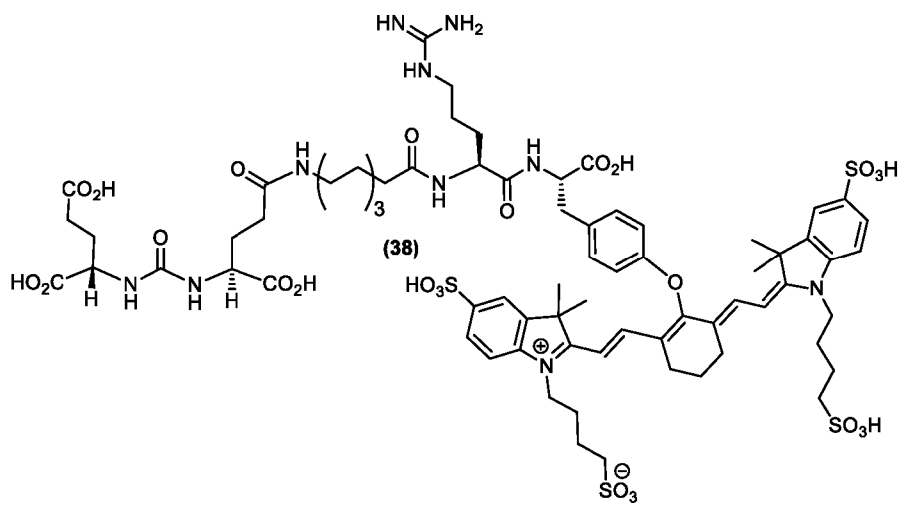
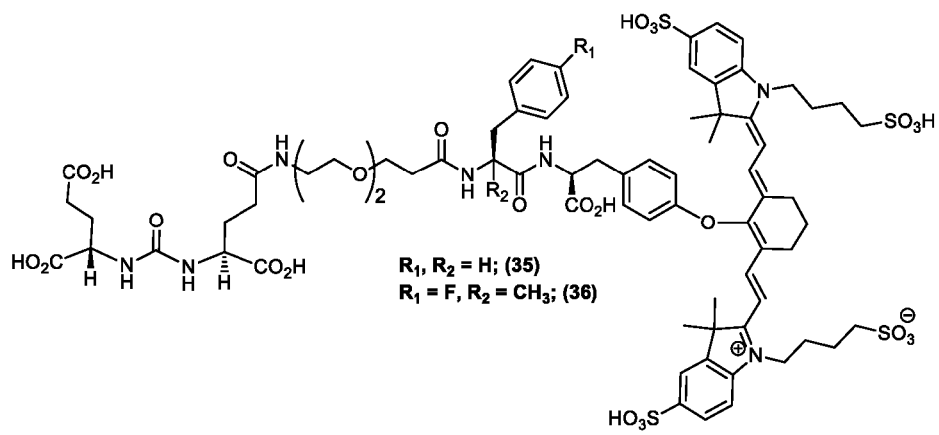
;

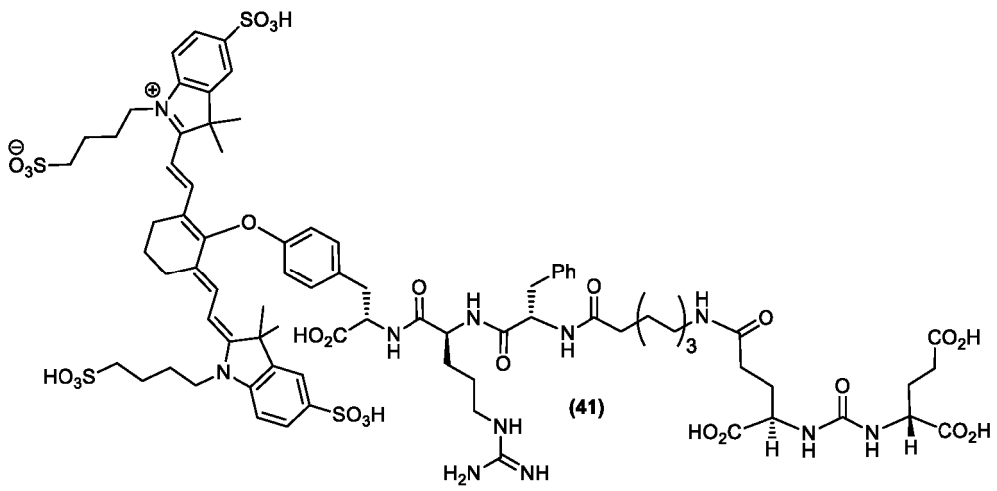
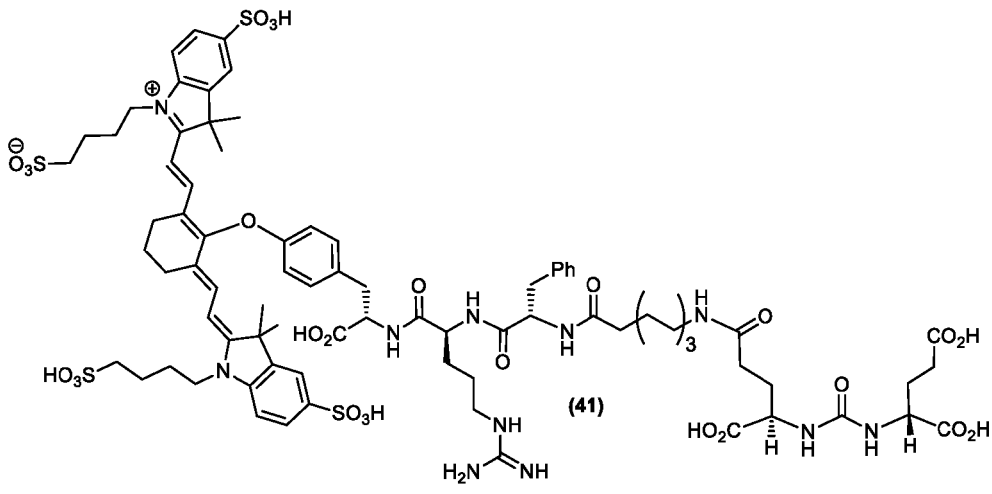
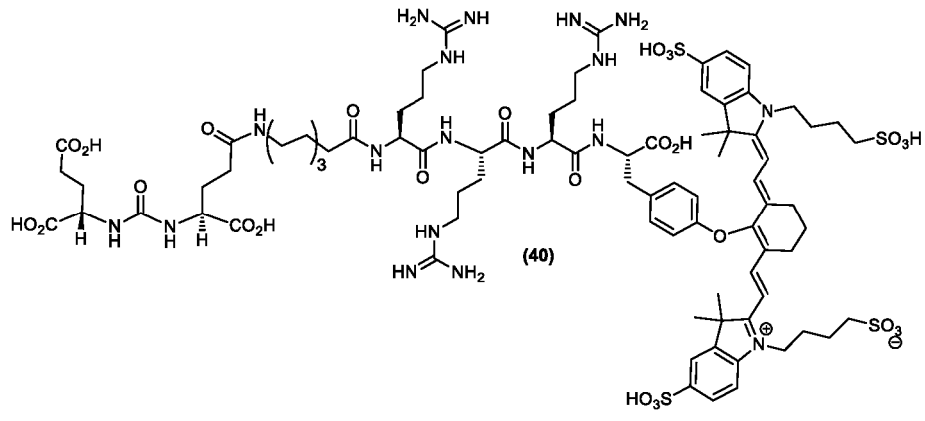


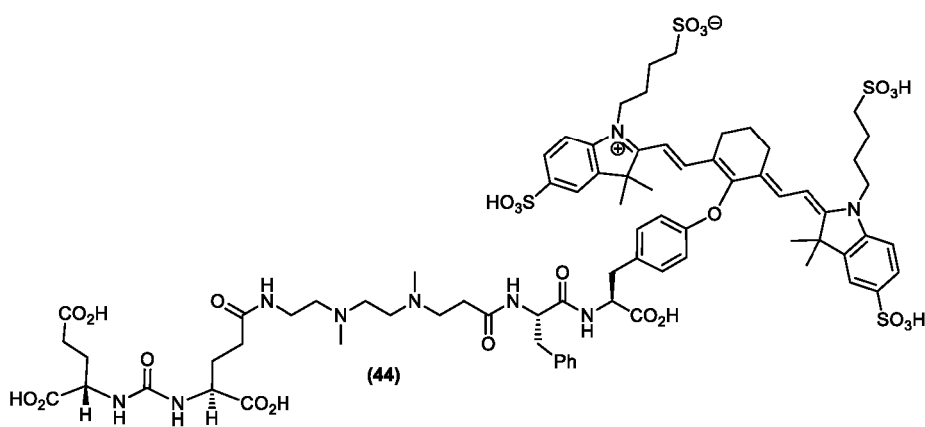
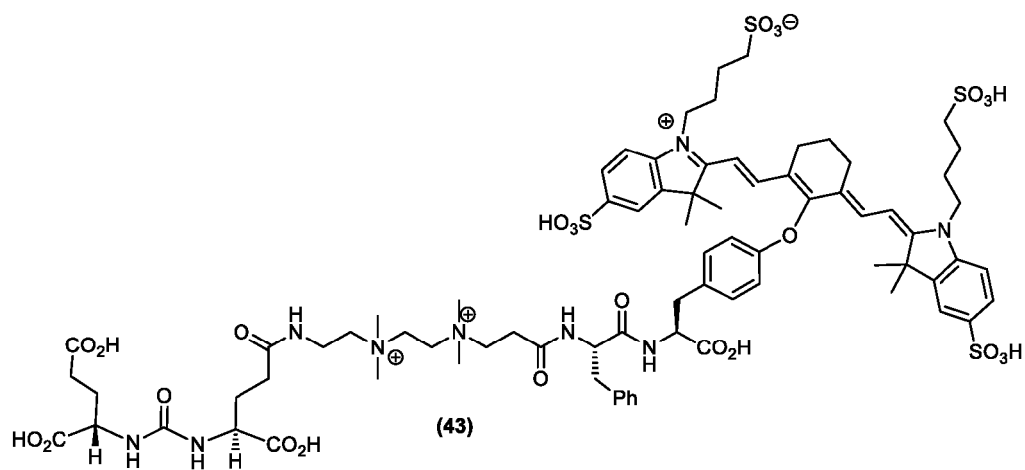
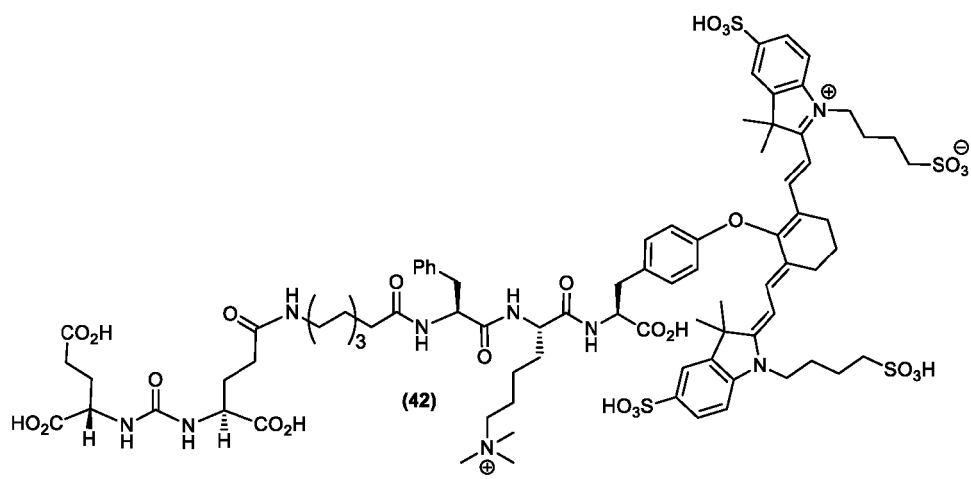


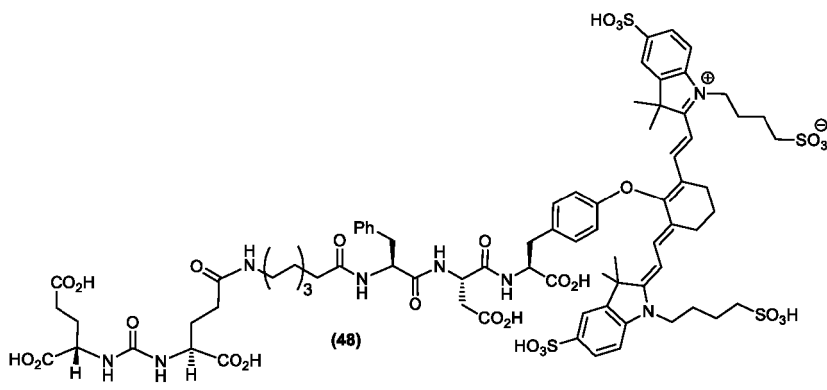
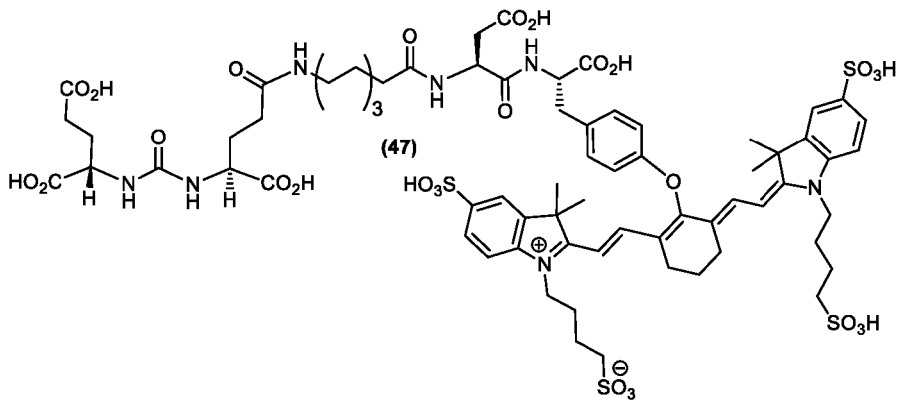
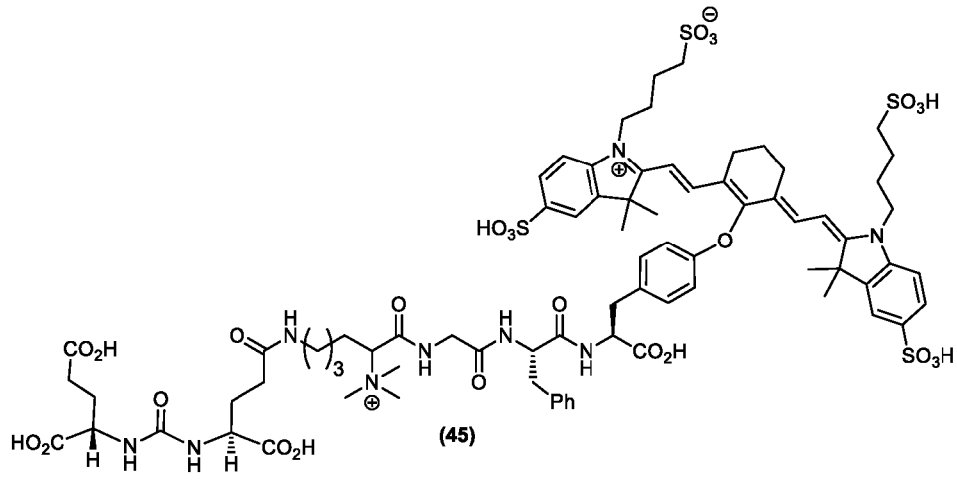




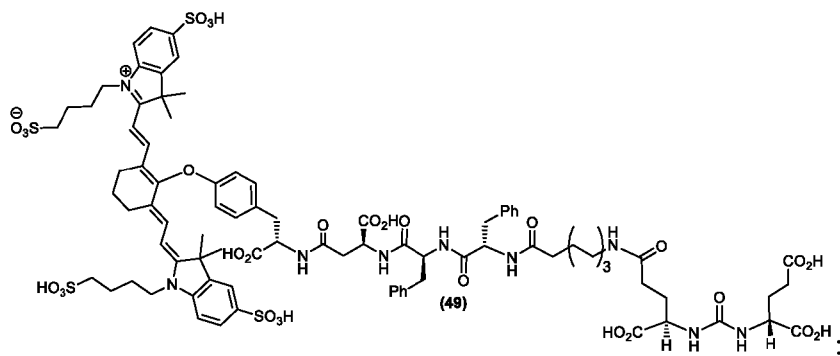


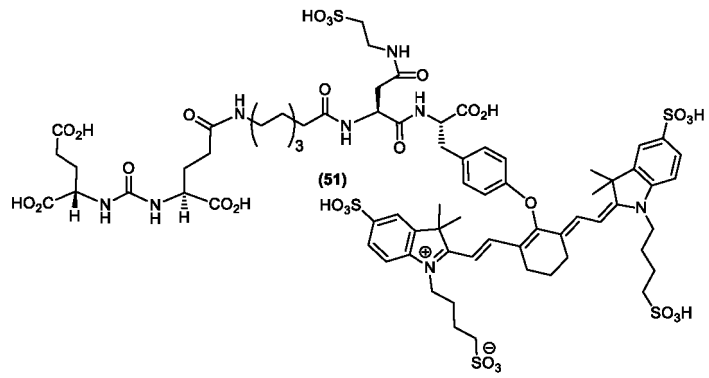
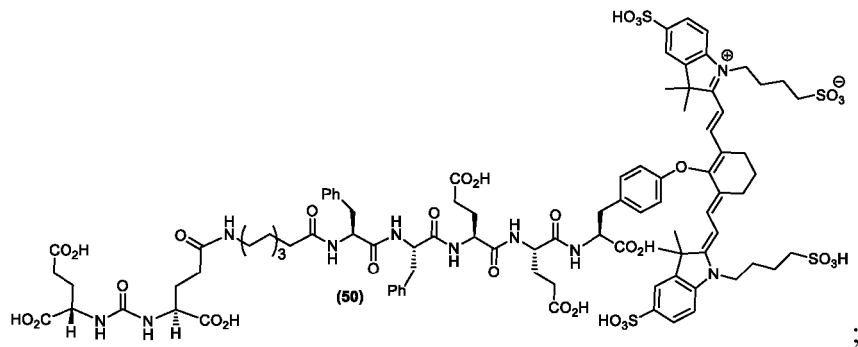




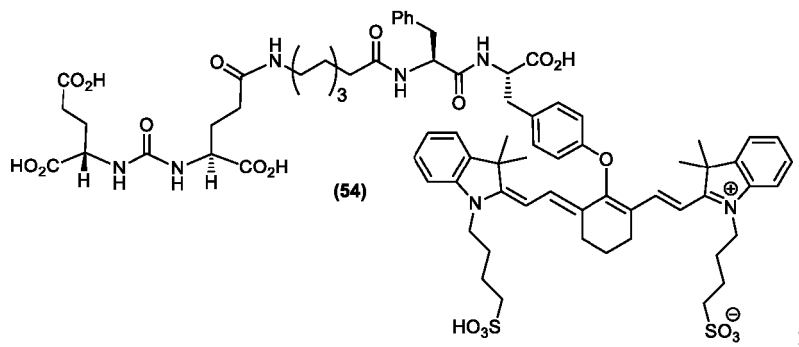
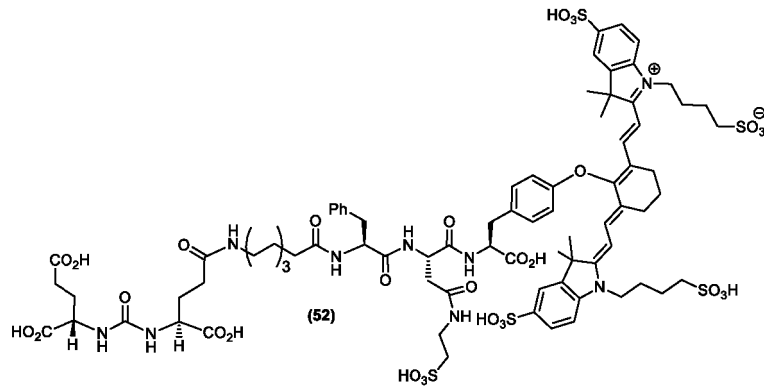


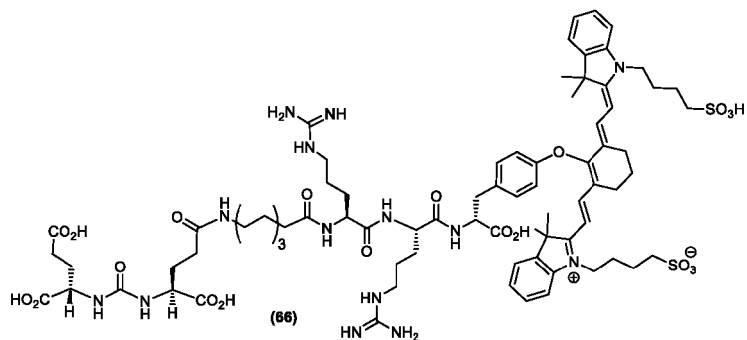
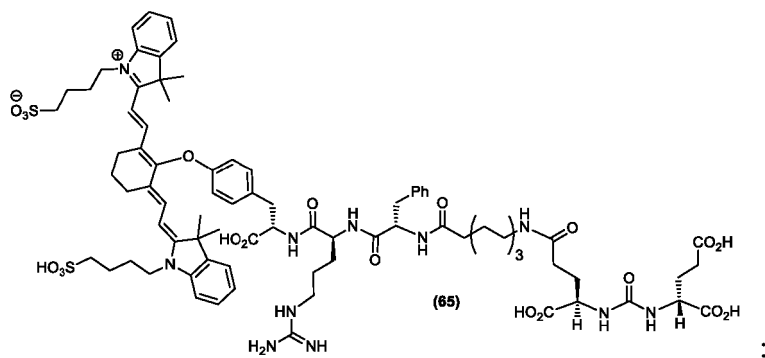
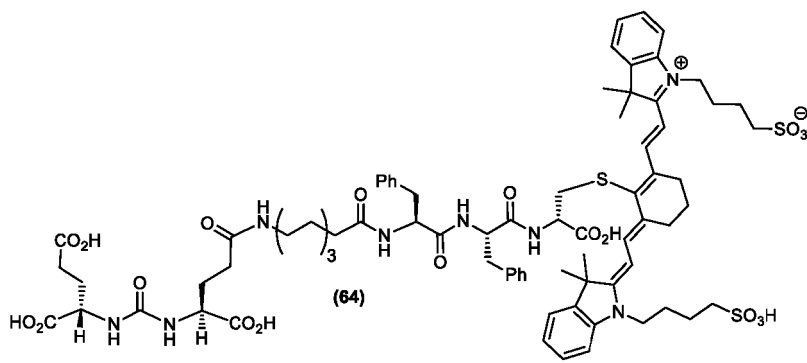
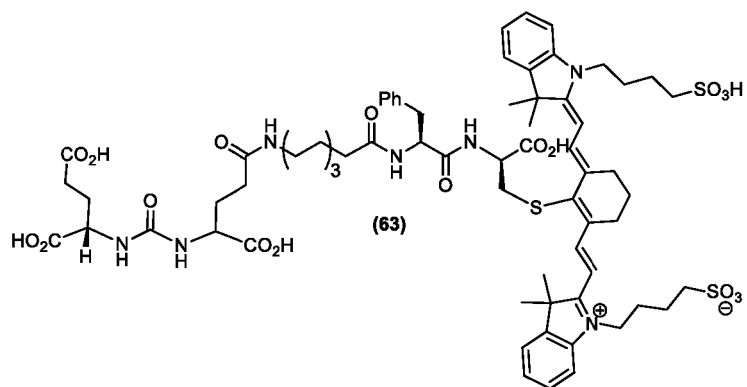
5

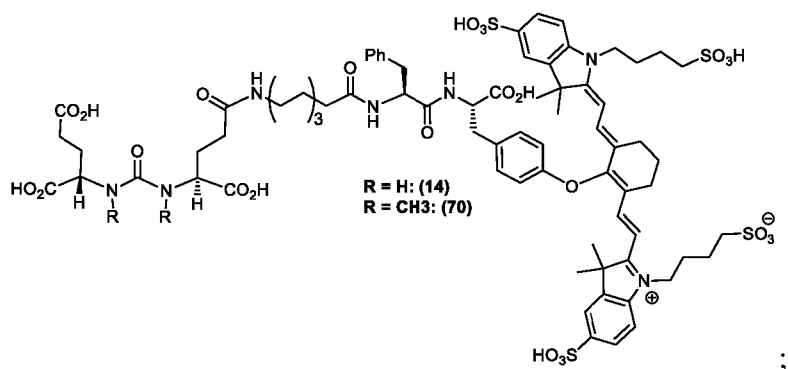
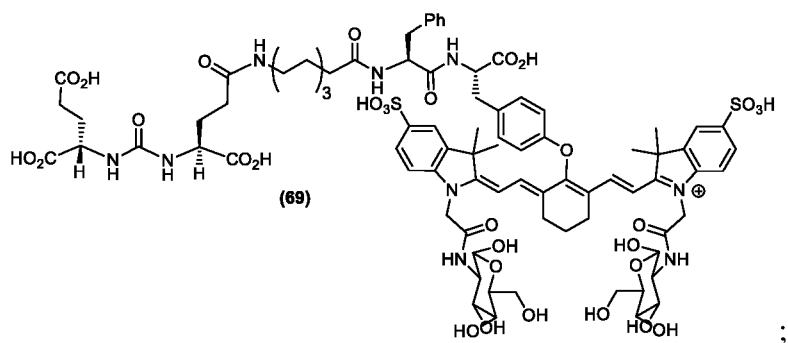
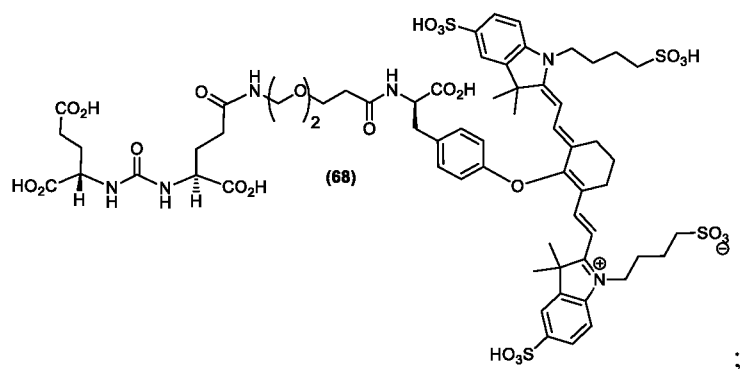
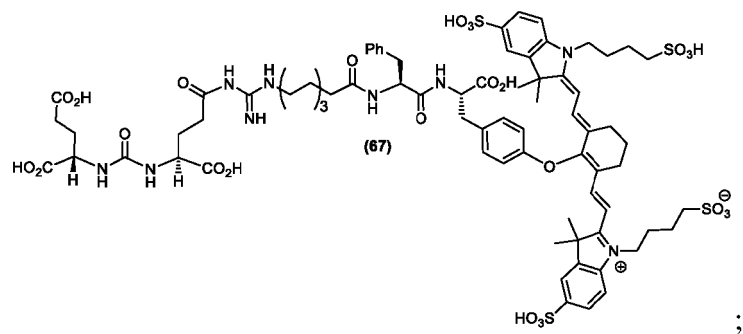


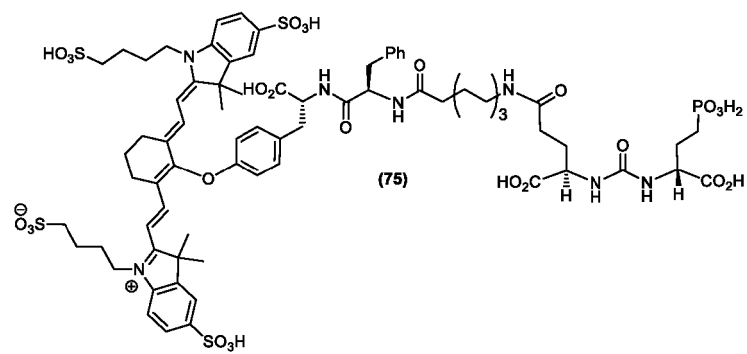
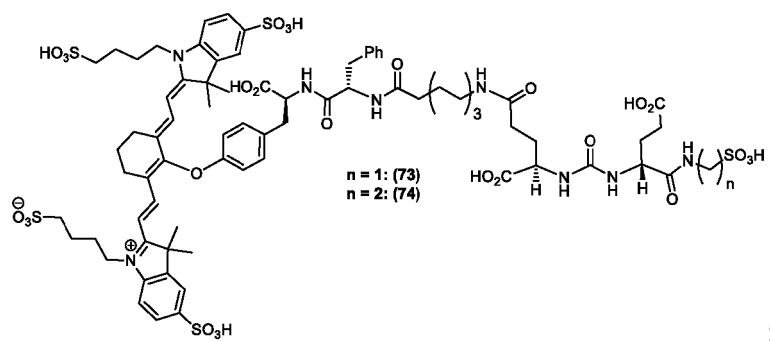
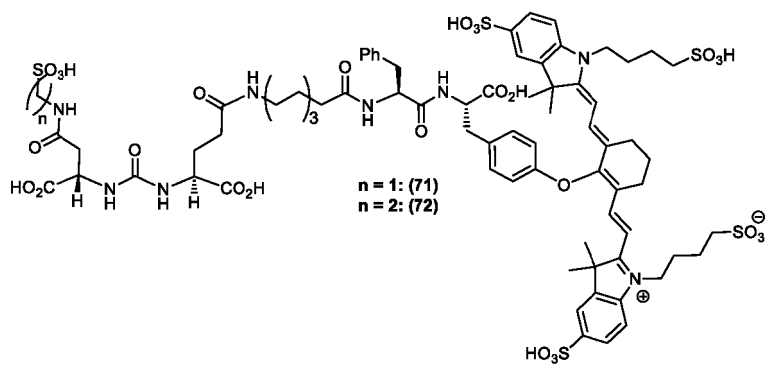


5

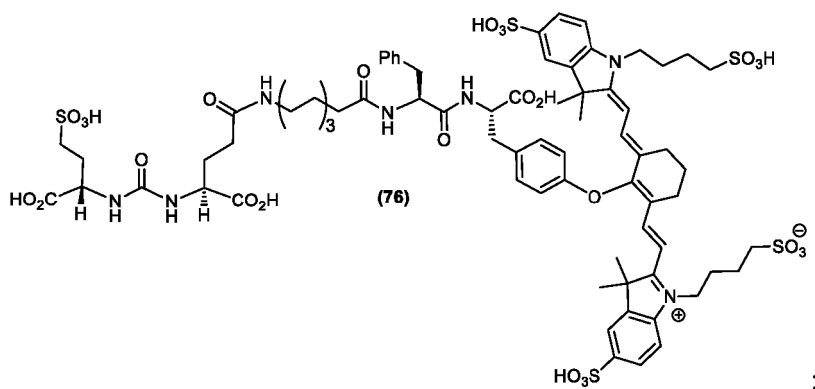


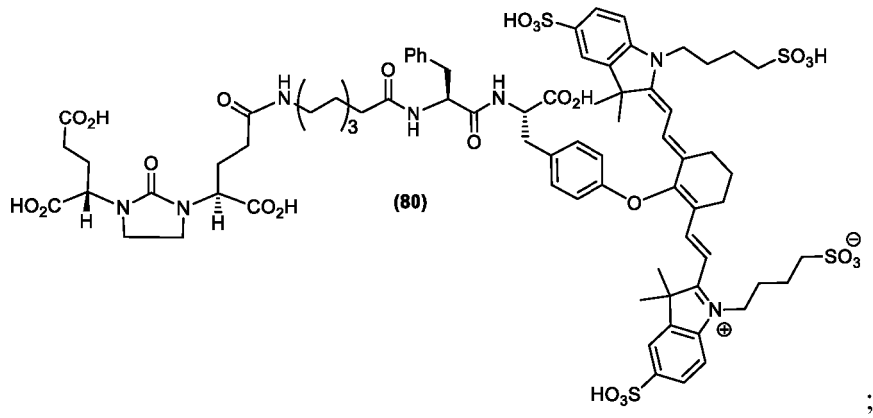
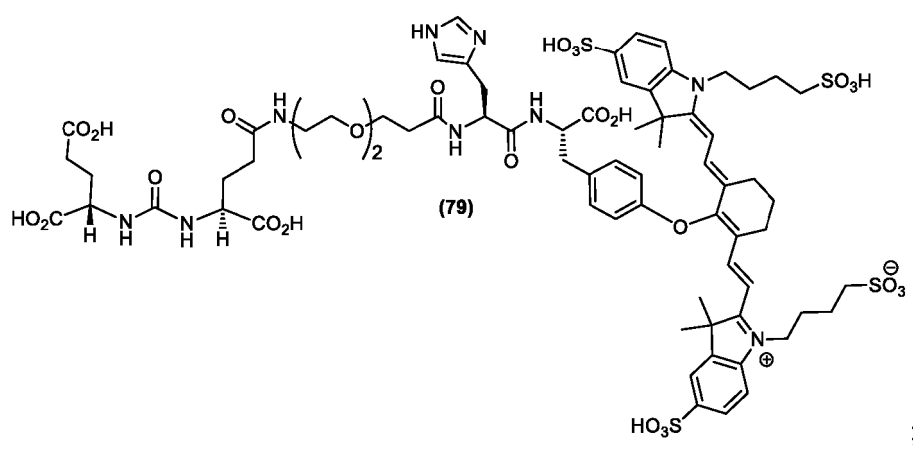
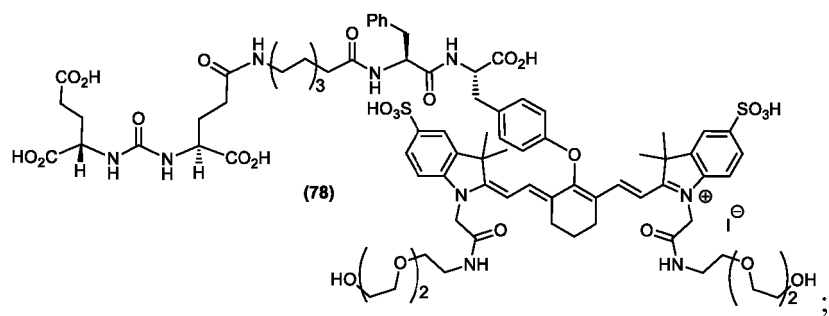
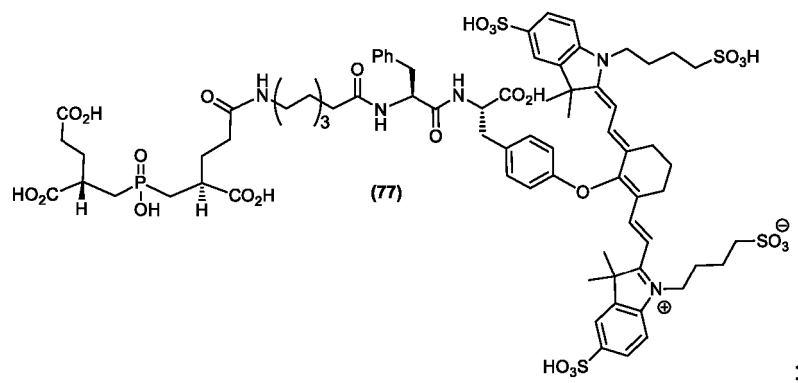


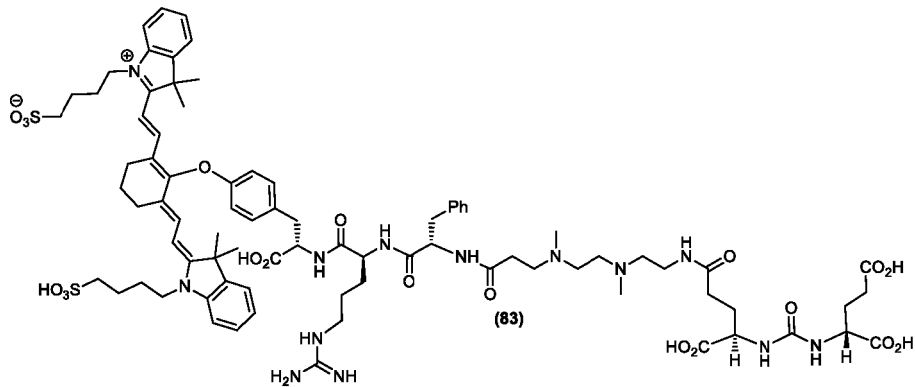
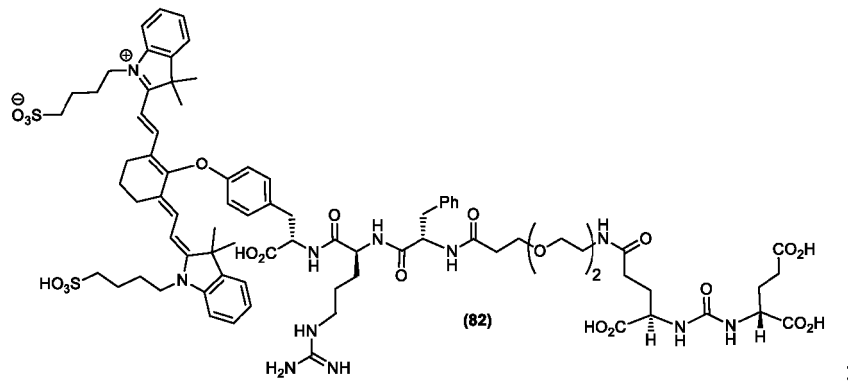
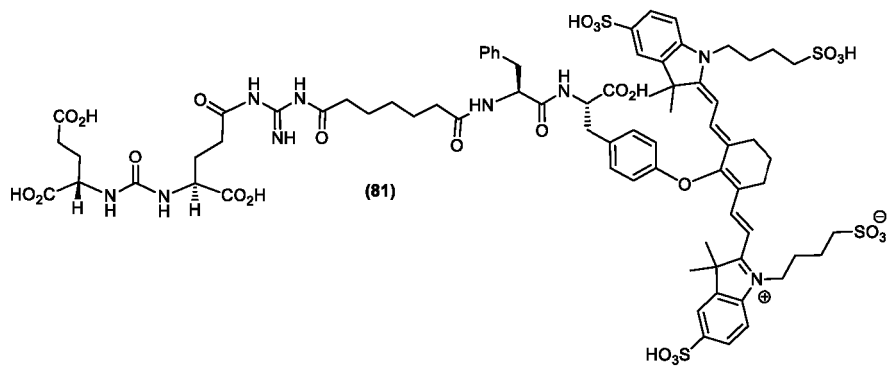




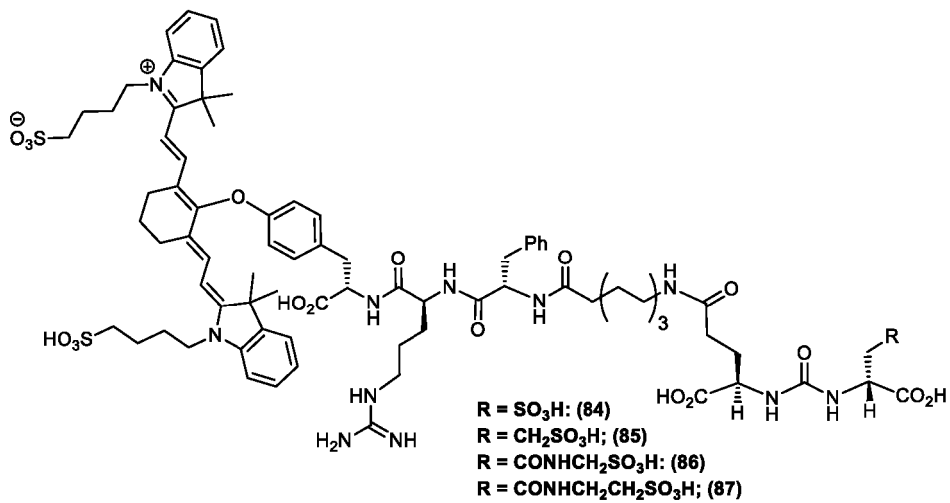
5

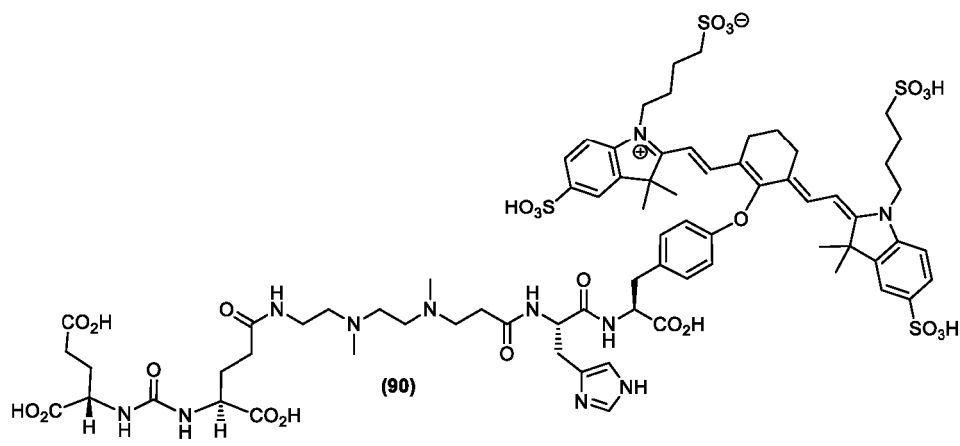
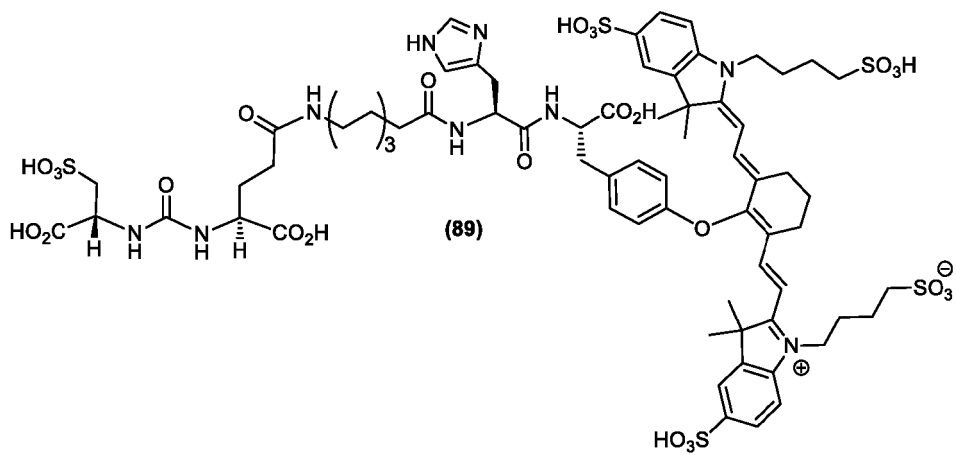
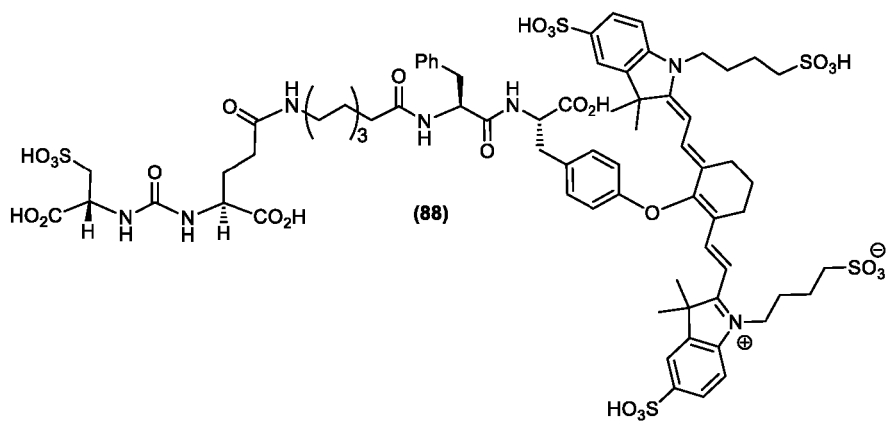


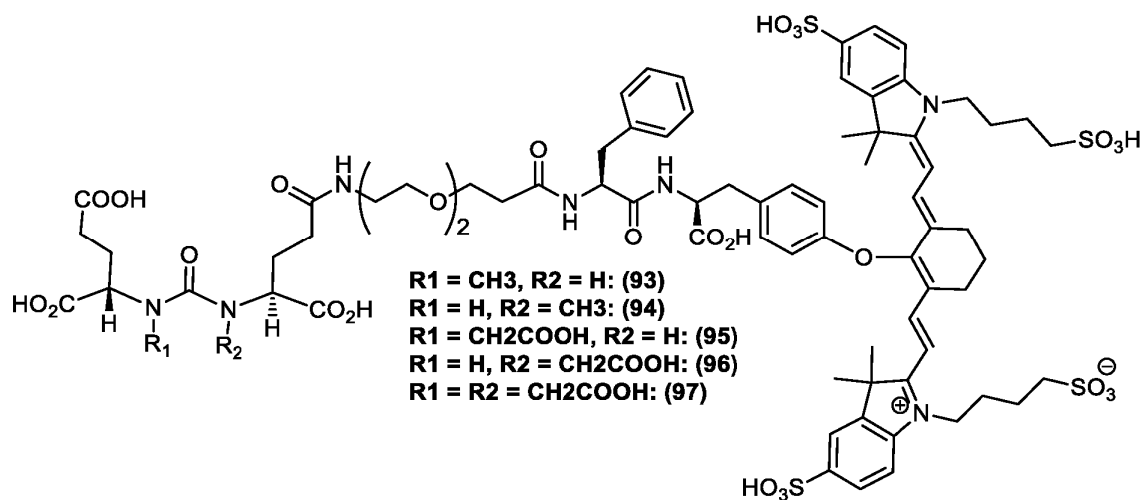
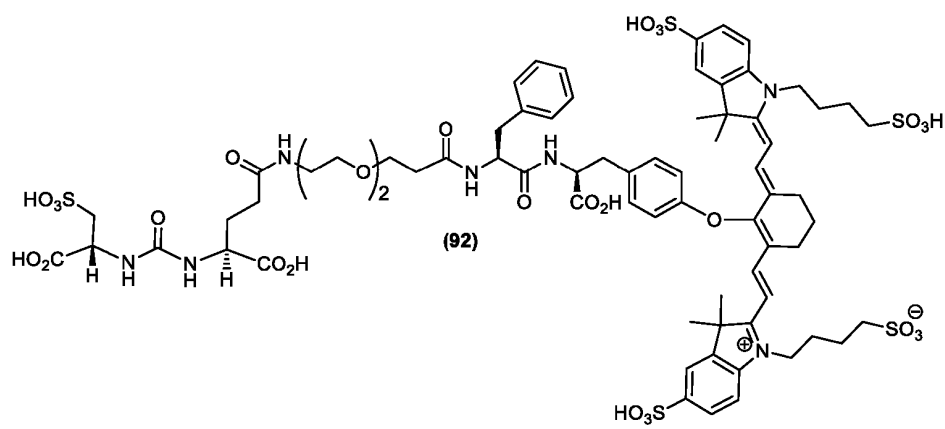
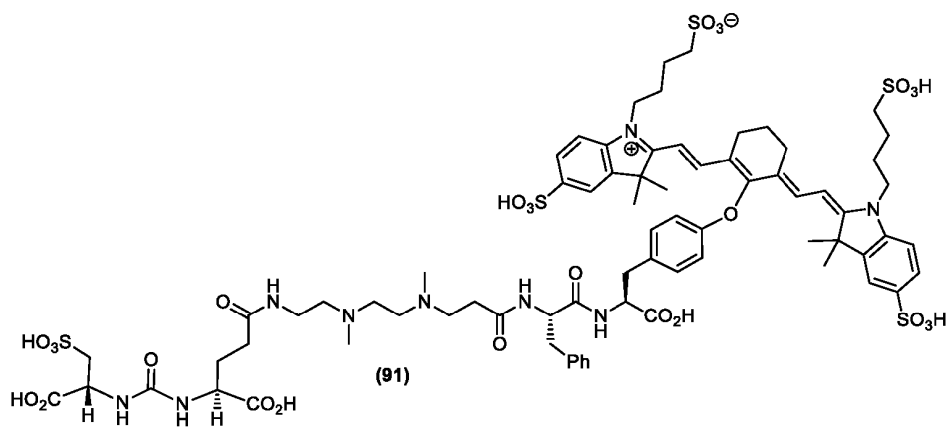


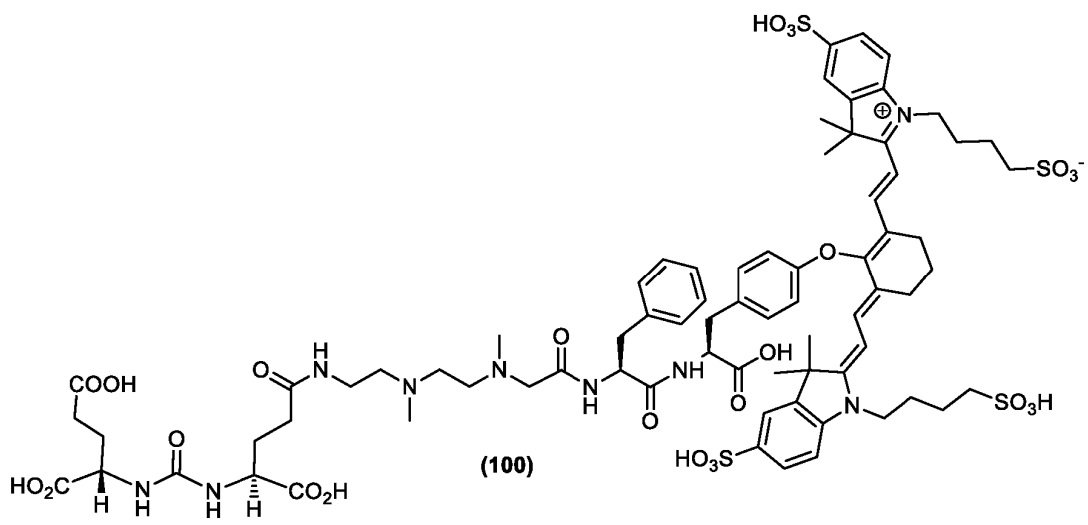
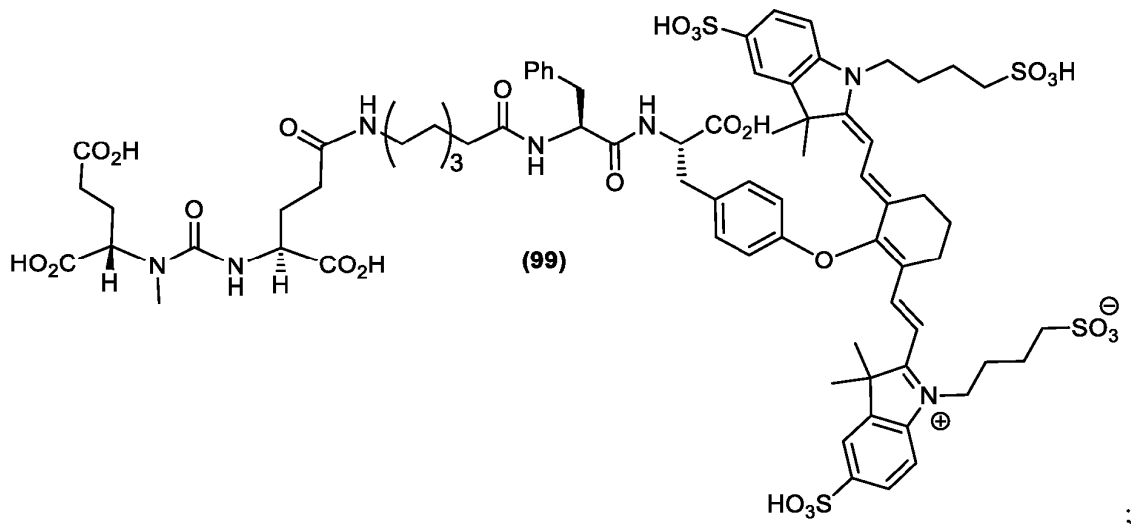
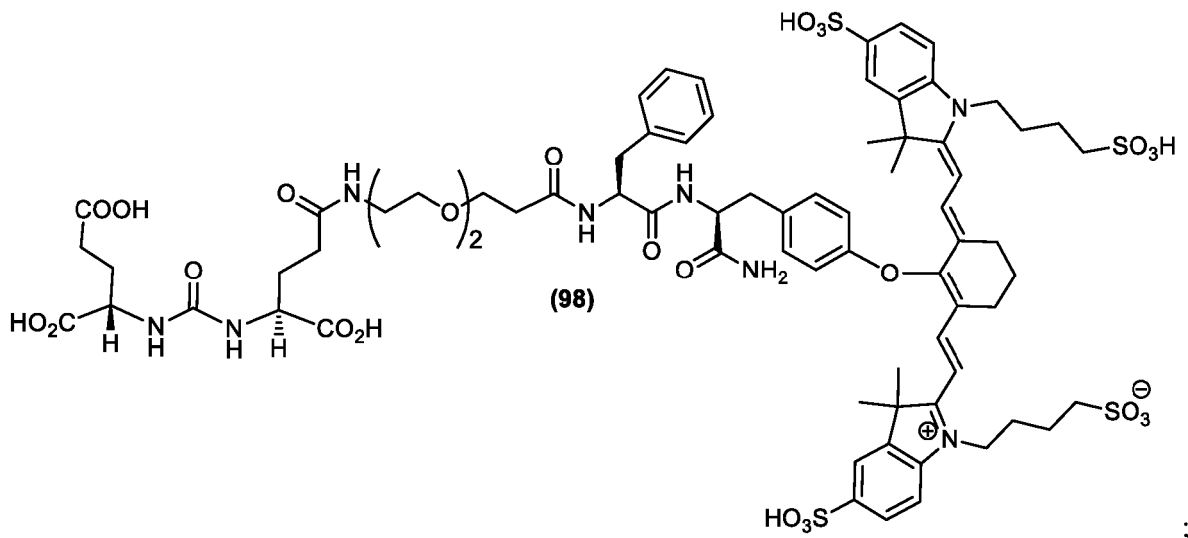


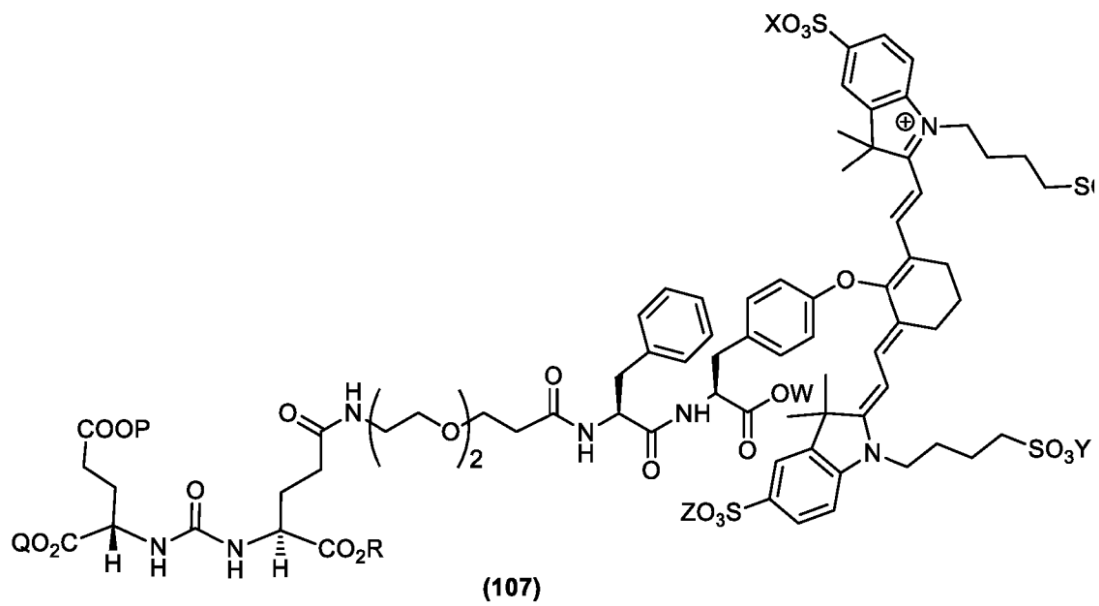
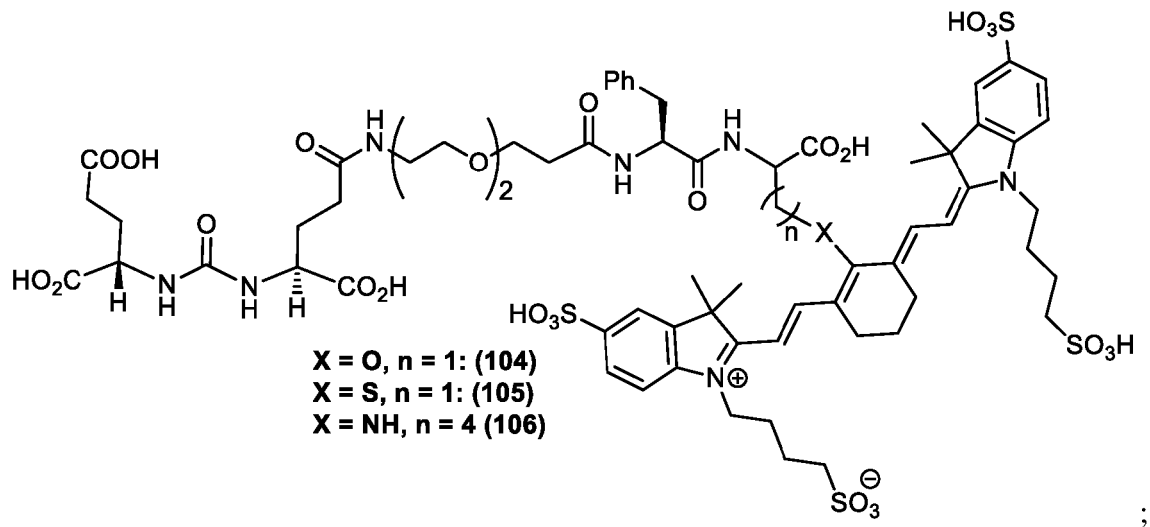
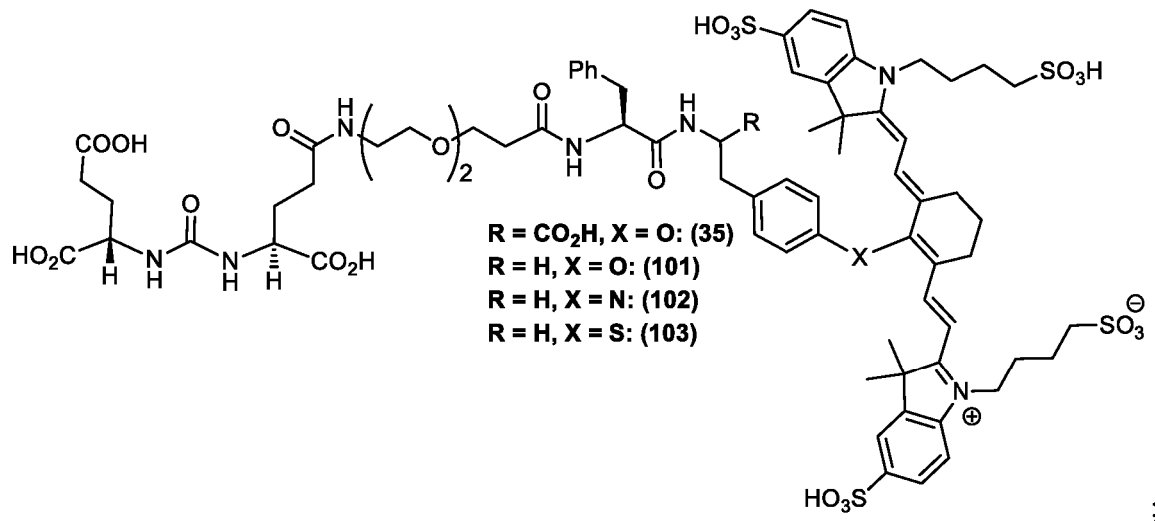
5



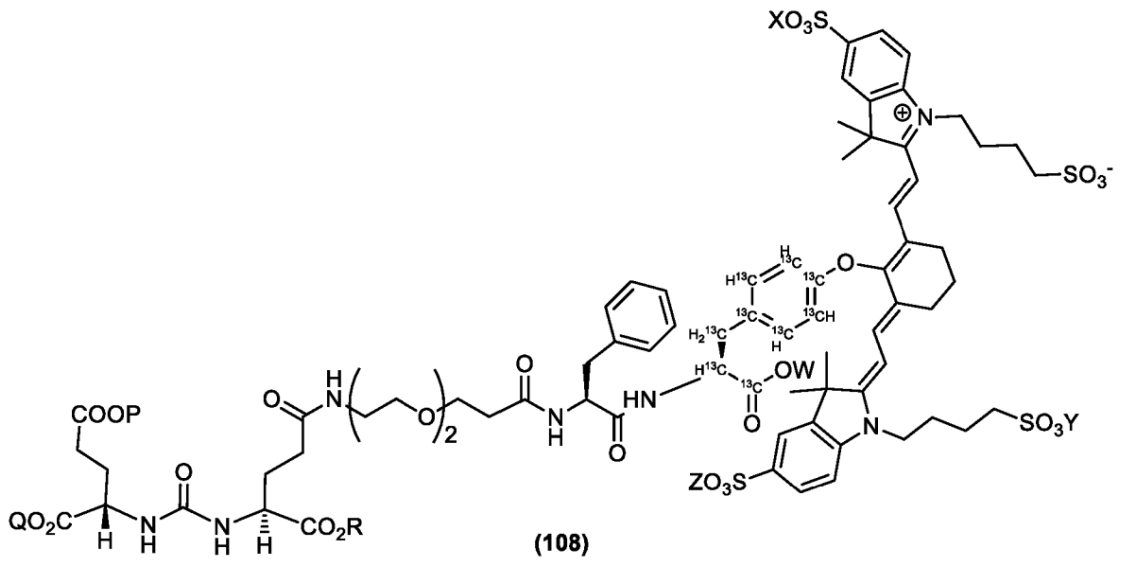






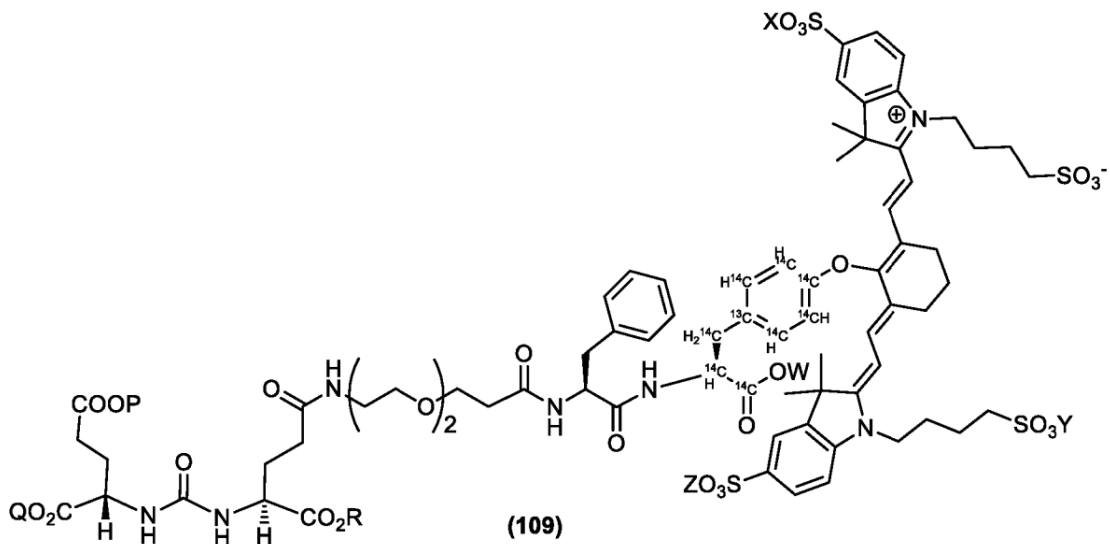


P, Q, R, W, X, Y, Z pueden ser H (35), Na, K, NH₄



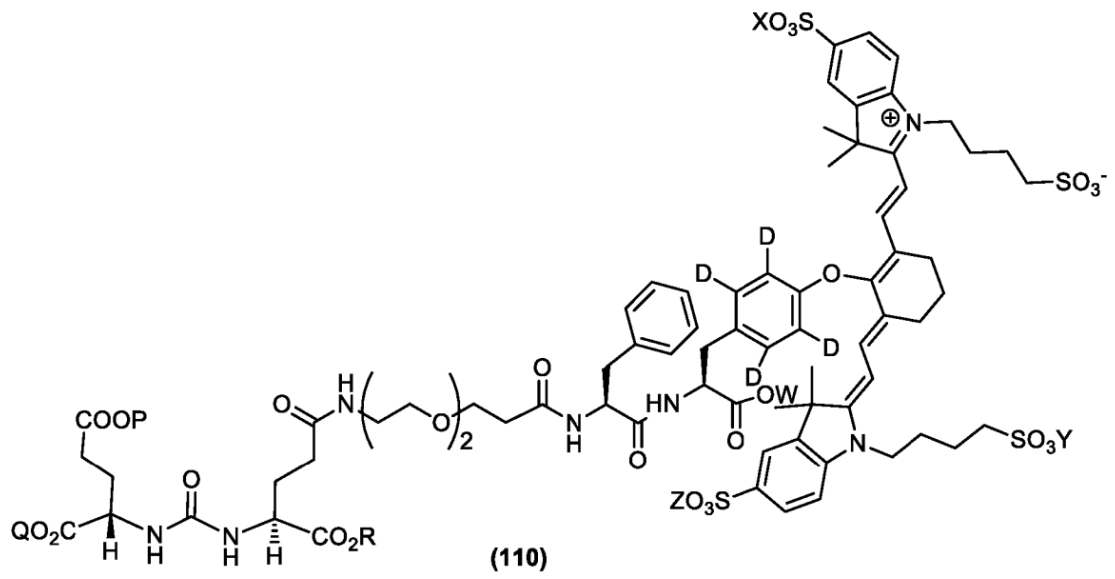
P, Q, R, W, X, Y, Z pueden ser H, Na, K, NH₄

;



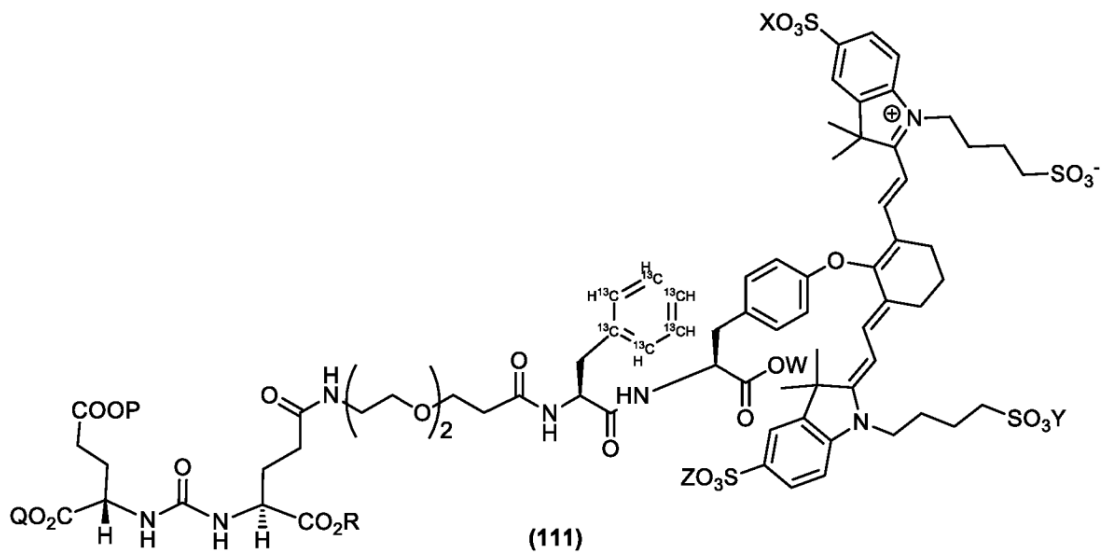
P, Q, R, W, X, Y, Z pueden ser H, Na, K, NH₄

;



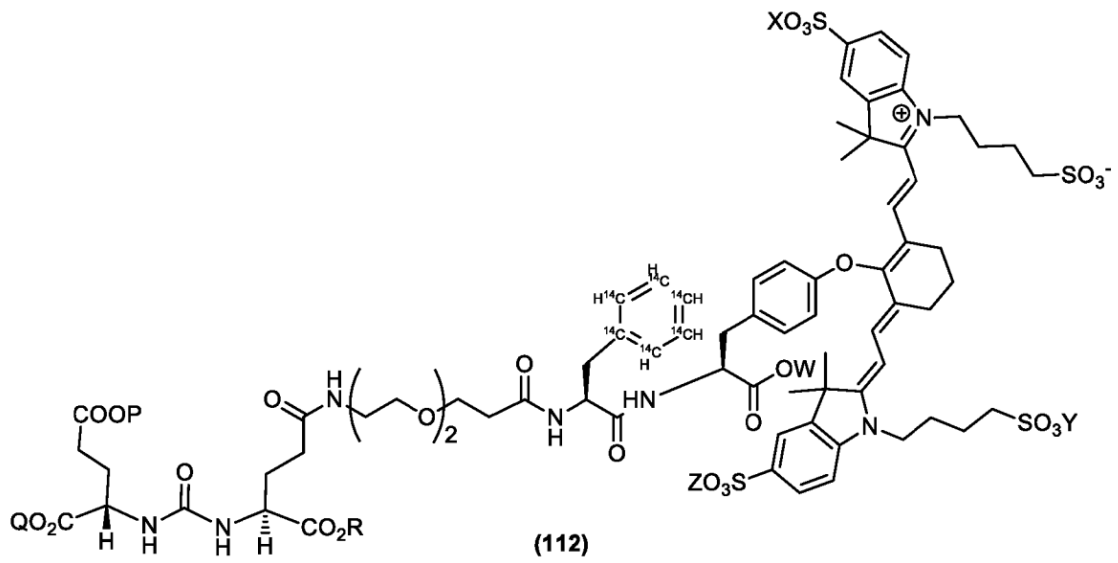
P, Q, R, W, X, Y, Z pueden ser H, Na, K, NH₄

;



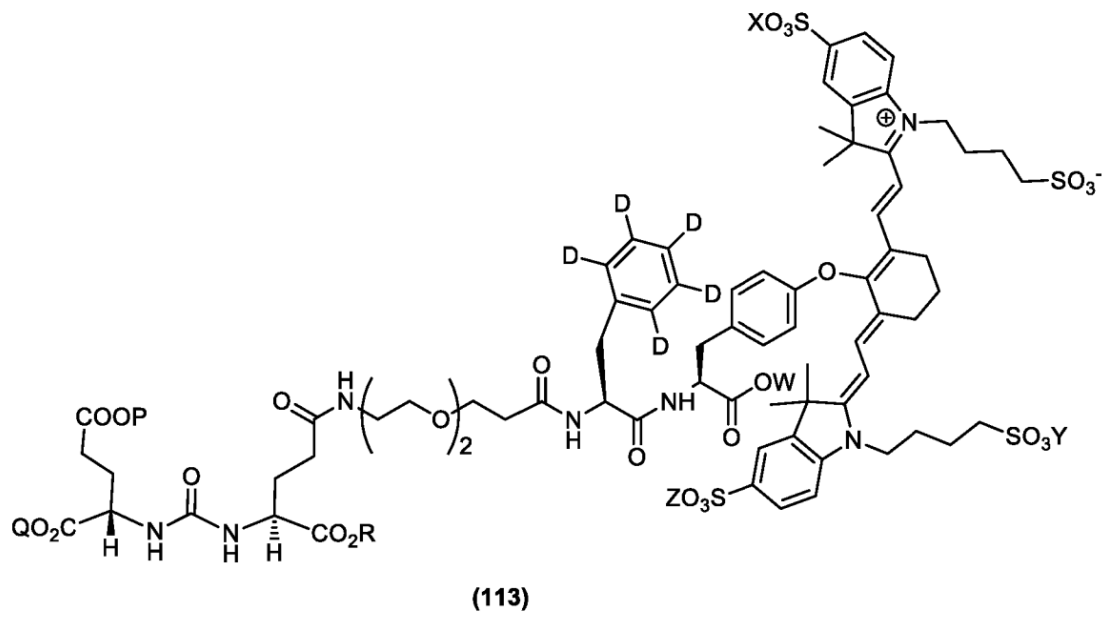
P, Q, R, W, X, Y, Z pueden ser H, Na, K, NH₄

;



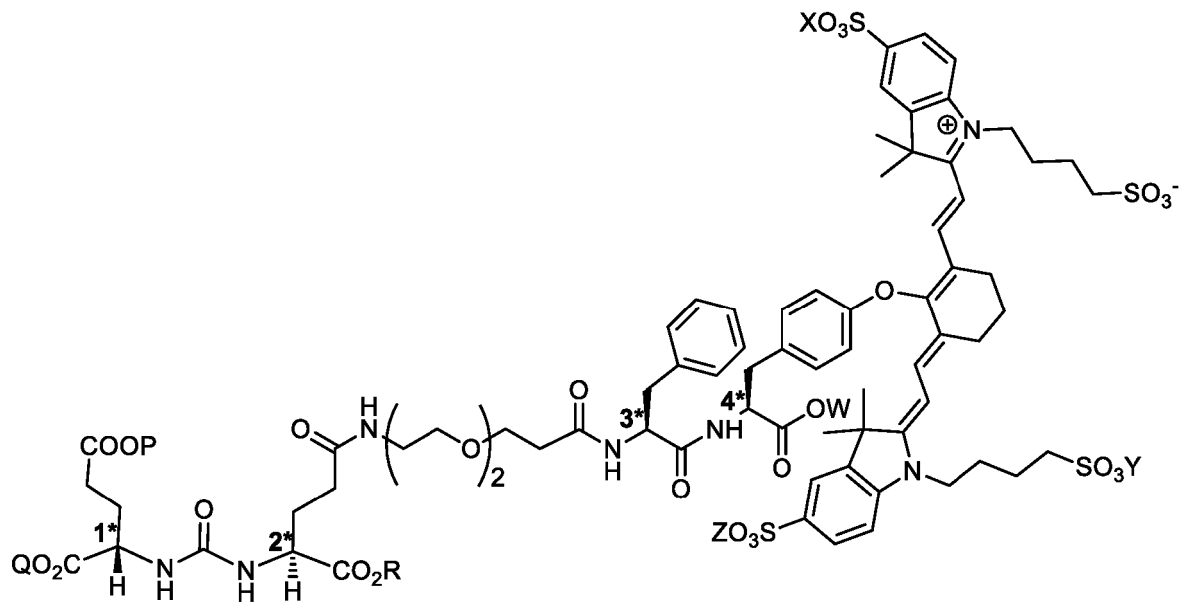
P, Q, R, W, X, Y, Z pueden ser H, Na, K, NH₄

;



P, Q, R, W, X, Y, Z pueden ser H (35), Na, K, NH₄

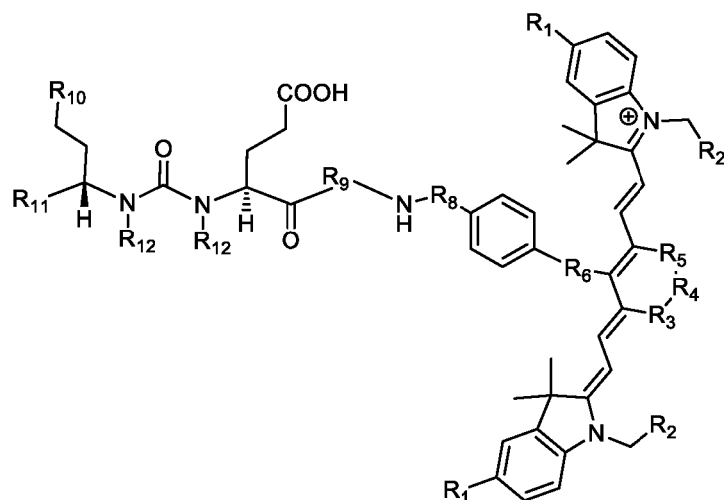
;



Centro quiral	1*	2*	3*	4*
Compuesto				
35	M	M	M	M
114	M	M	M	D
115	M	M	D	M
116	M	M	D	D
117	M	D	M	M
118	M	D	M	D
119	M	D	D	M
120	M	D	D	D
121	D	M	M	M
122	D	M	M	D
123	D	M	D	M
124	D	M	D	D
125	D	D	M	M
126	D	D	M	D
127	D	D	D	M
128	D	D	D	D

5 o una mezcla racémica de los mismos.

3. Un compuesto que tiene la fórmula estructural:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R₁ representa un hidrógeno o SO₃H;

5 R₂ representa un hidrógeno o CH₃ o C₃H₆SO₃⁻ o C₃H₆SO₃H o C₄H₈SO₃⁻ o C₄H₈SO₃H o C₃H₆N⁺(CH₃)₃;

R₃, y R₅ representan cada uno un carbono, opcionalmente uno o más enlaces compartidos, u oxígeno o azufre, o nitrógeno

R₄ representa un carbono opcionalmente con uno o más enlaces compartidos;

10 R₆ representa nitrógeno, oxígeno o azufre o ningún átomo (enlace directo C-C entre el anillo aromático y el anillo de vinilo);

R₇ es opcional y, cuando está presente, representa un grupo sustituyente aromático donante de electrones;

R₈ es opcional y, cuando está presente, representa conectores con aminoácidos aromáticos tales como Phe, Trp, His, Tyr, y/o aminoácidos catiónicos como Arg, Lys, y/o aminoácidos aniónicos tales como Asp, Glu, y/o aminoácidos no naturales de ácidos aromáticos/catiónicos/aniónicos;

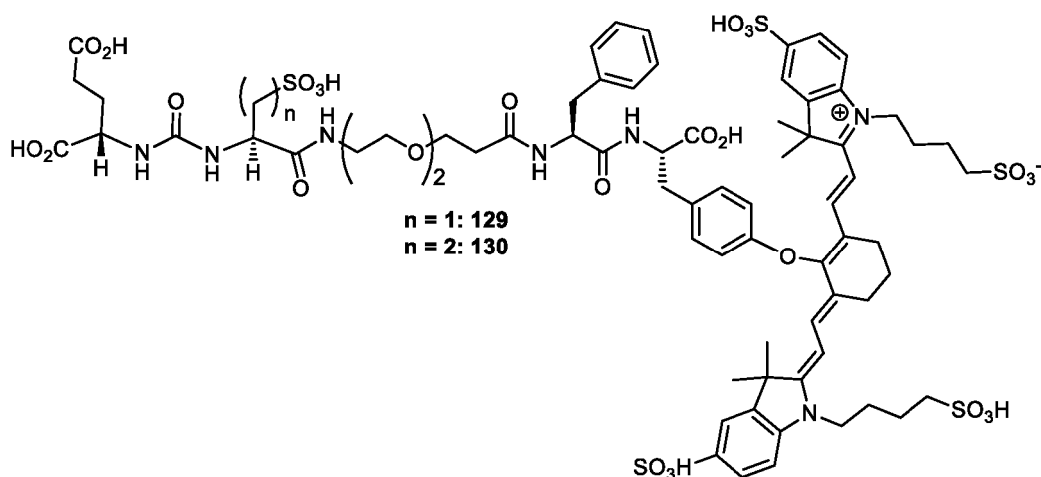
15 R₉ es opcional y, cuando está presente, representa una cadena carbonada lineal, o conectores de polietilenglicol, conectores de polietilenamina o un conector catiónico;

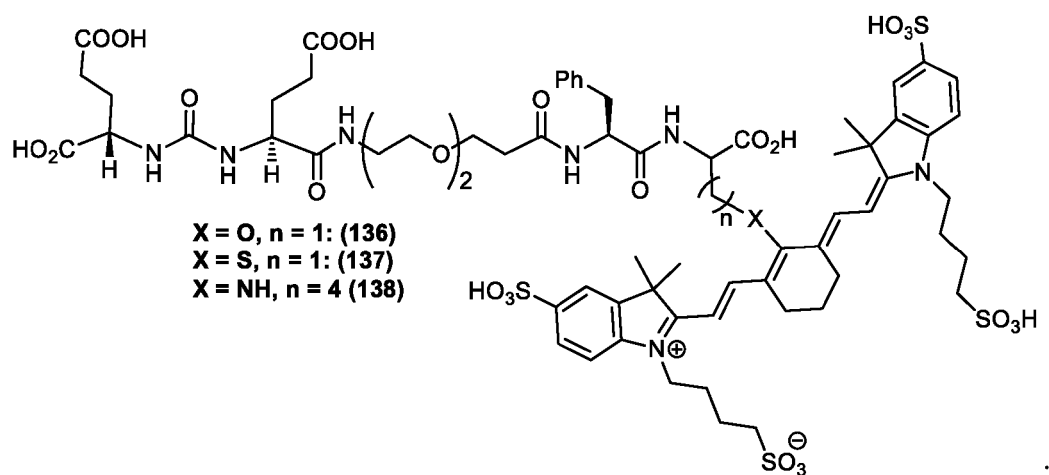
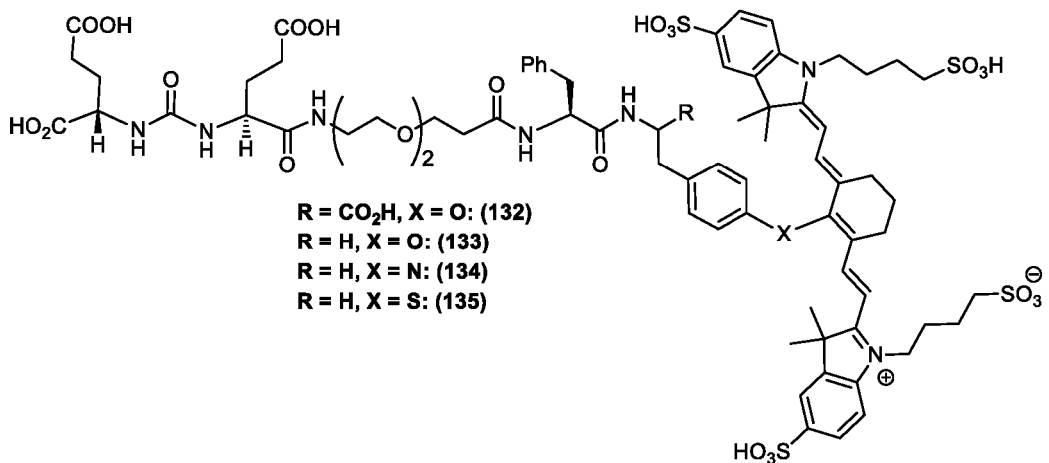
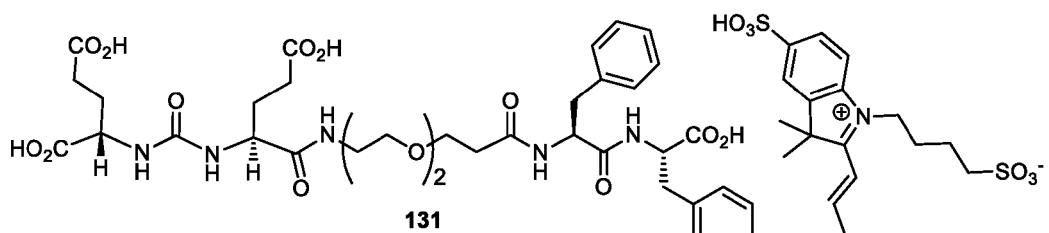
R₁₀ representa un CO₂H, PO₃H₂, SO₃H, CH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂CH₂SO₃H;

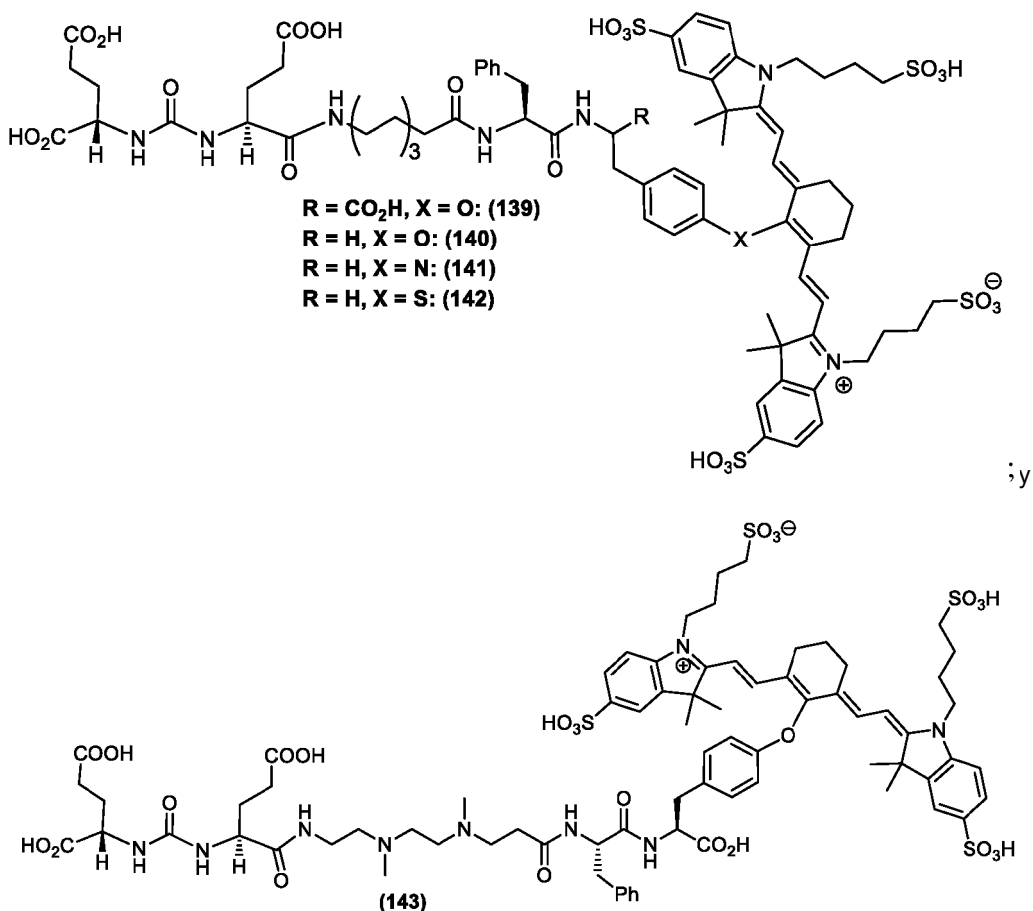
R₁₁ representa CO₂H, SO₃H, CH₂CONHCH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂CH₂SO₃H; y

20 R₁₂ representa independientemente representa un hidrógeno, un grupo metilo, CH₂COOH, un CH₂ y cada uno puede representar, opcionalmente, un CH₂ que comparte un enlace.

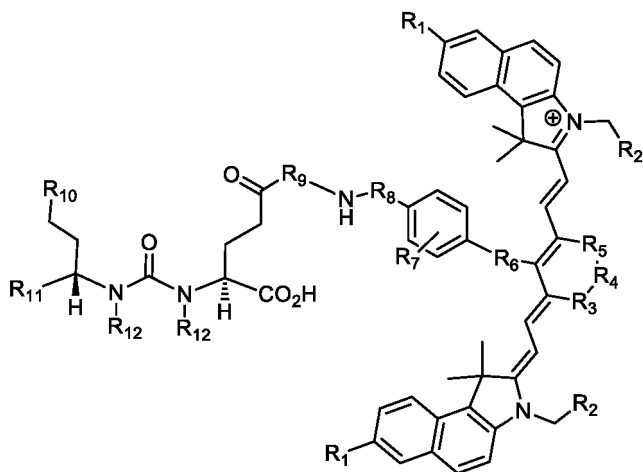
4. El compuesto de la reivindicación 3, en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:







5 5. Un compuesto que tiene la fórmula estructural:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

- 10 R₁ representa un hidrógeno o SO₃H;
 R₂ representa un hidrógeno o CH₃ o C₃H₆SO₃⁻ o C₃H₆SO₃H o C₄H₈SO₃⁻ o C₄H₈SO₃H o C₃H₆N⁺(CH₃)₃;
 R₃, y R₅ representan cada uno un carbono, opcionalmente uno o más enlaces compartidos, u oxígeno o azufre, o nitrógeno
 R₄ representa un carbono opcionalmente con uno o más enlaces compartidos;
 15 R₆ representa nitrógeno, oxígeno o azufre o ningún átomo (enlace directo C-C entre el anillo aromático y el anillo de vinilo);
 R₇ es opcional y, cuando está presente, representa un grupo sustituyente aromático donante de electrones;
 R₈ es opcional y, cuando está presente, representa conectores con aminoácidos aromáticos tales como Phe, Trp, His o Tyr, y/o aminoácidos catiónicos como Arg, Lys, y/o aminoácidos aniónicos tales como Asp, Glu, y/o aminoácidos no
 20 naturales de ácidos aromáticos/catiónicos/aniónicos;

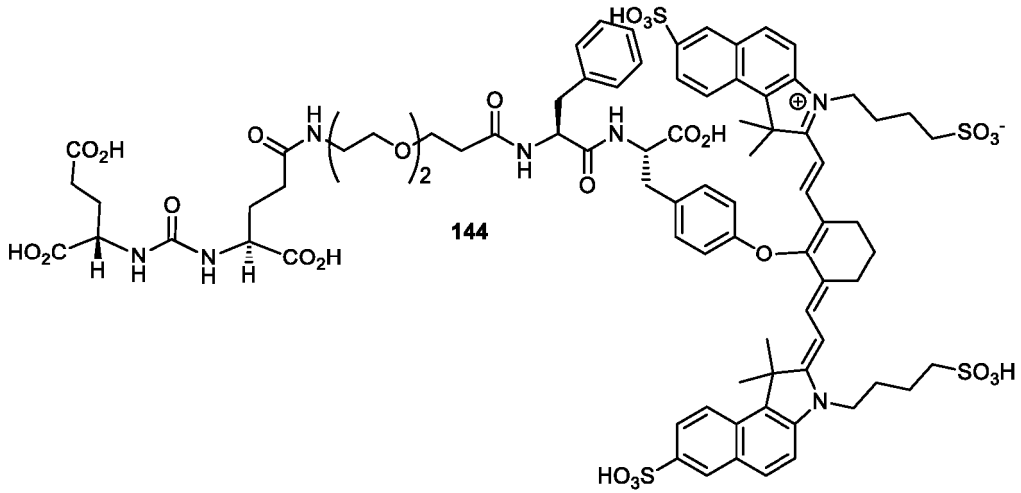
R₉ es opcional y, cuando está presente, representa una cadena carbonada lineal, o conectores de polietilenglicol, conectores de polietilenaamina o un conector catiónico;

R₁₀ representa un CO₂H, PO₃H₂, SO₃H, CH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂CH₂SO₃H;

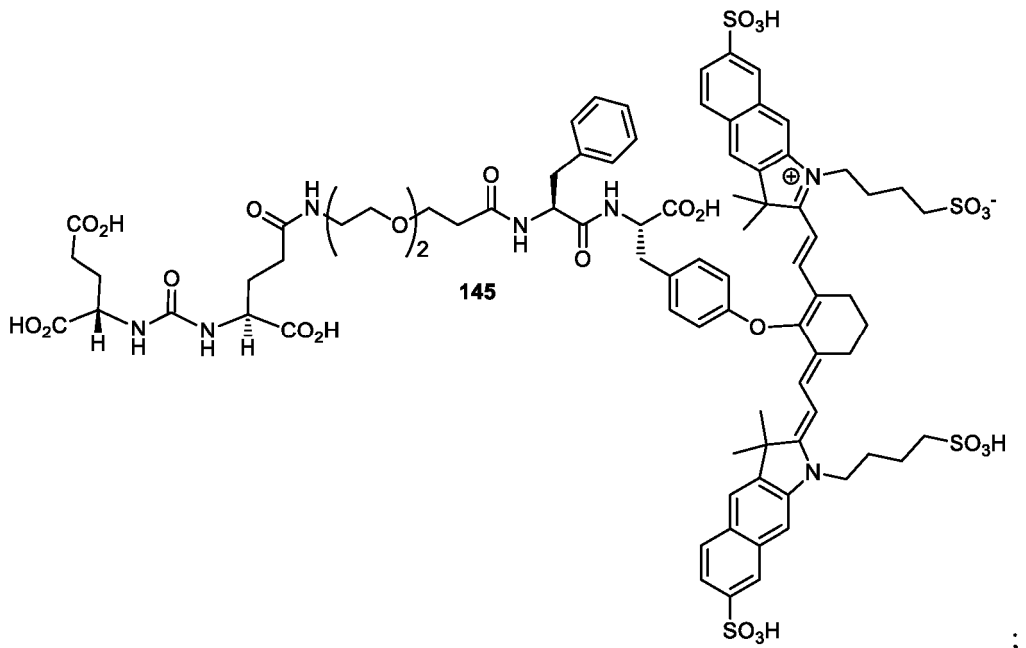
R₁₁ representa CO₂H, SO₃H, CH₂CONHCH₂SO₃H, CH₂CONHCH₂CH₂SO₃H; y

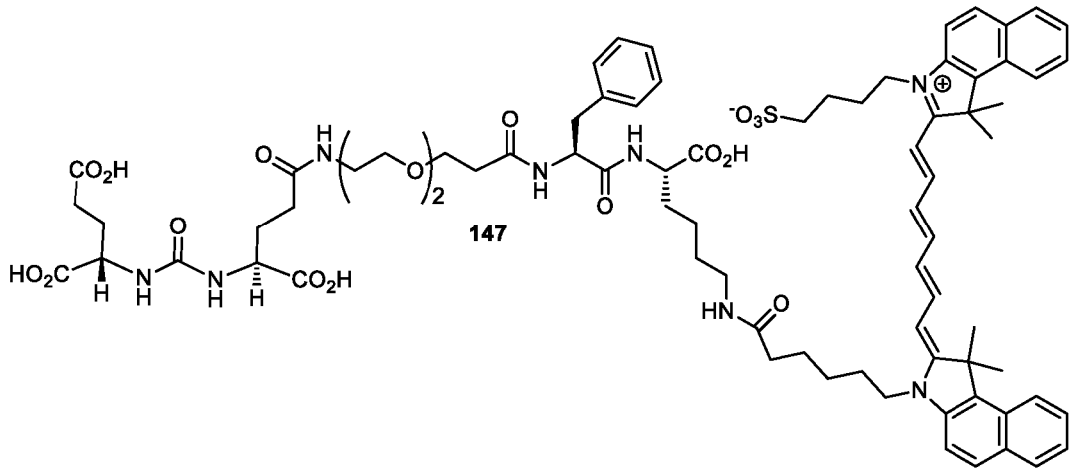
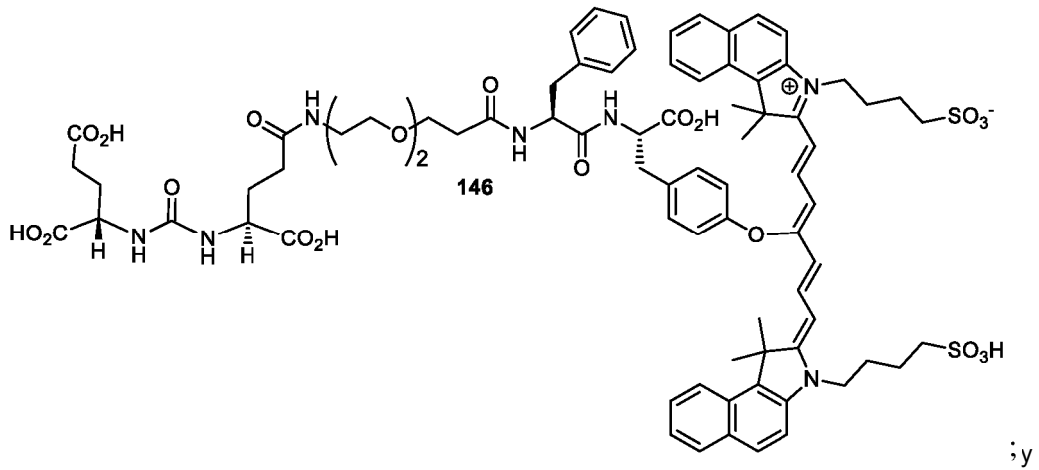
- 5 R₁₂ independientemente representa un hidrógeno, un grupo metilo, CH₂COOH, un CH₂ y cada uno puede representar, opcionalmente, un CH₂ que comparte un enlace.

6. El compuesto de la reivindicación 5, en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

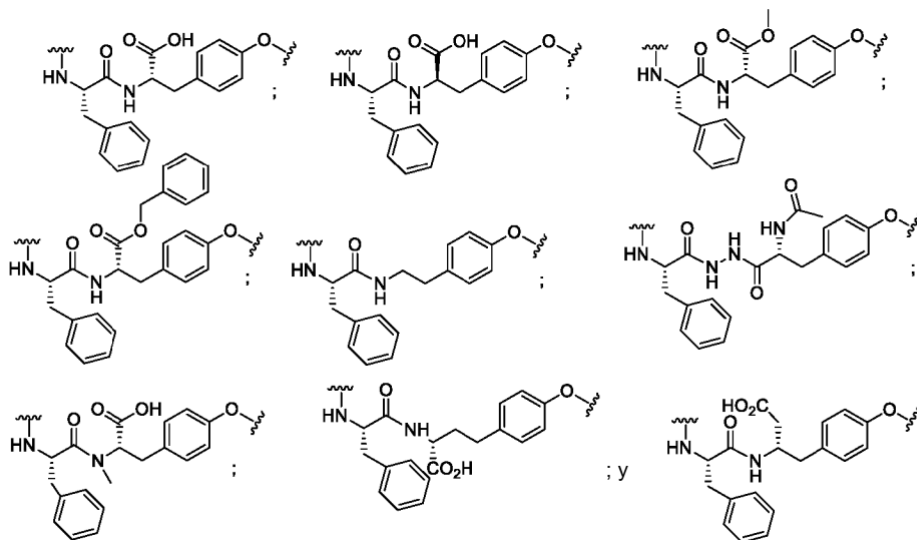


10





- 5 7. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde el aminoácido se selecciona del grupo que consiste en:



- 10 o mezclas racémicas de los mismos.

8. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde el compuesto tiene un máximo de absorción y de emisión entre aproximadamente 500 nm y aproximadamente 900 nm.

9. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el compuesto es capaz de, o se adapta para, emitir fluorescencia después de la distribución del mismo en un tejido.

5 10. El compuesto de la reivindicación 9, en donde las células tisulares se seleccionan del grupo que consiste en células de próstata, células de cáncer de próstata, células de cáncer de vejiga, células de cáncer de páncreas, células de cáncer de hígado, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de riñón, células de sarcoma, células de cáncer de mama, células de cáncer cerebral, células de carcinoma neuroendocrino, células de cáncer de colon, células de cáncer testicular y células de melanoma.

10 11. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

15 12. Un kit que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

Figura 1: Estructuras de los agentes de obtención de imágenes en el NIR con conector DUPA dirigidos al PSMA con una longitud de conector variable

(a) Síntesis de los conjugados de DUPA-conector-colorante NIR

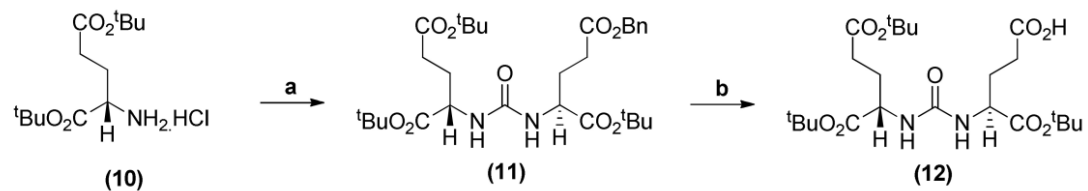


Figura 2

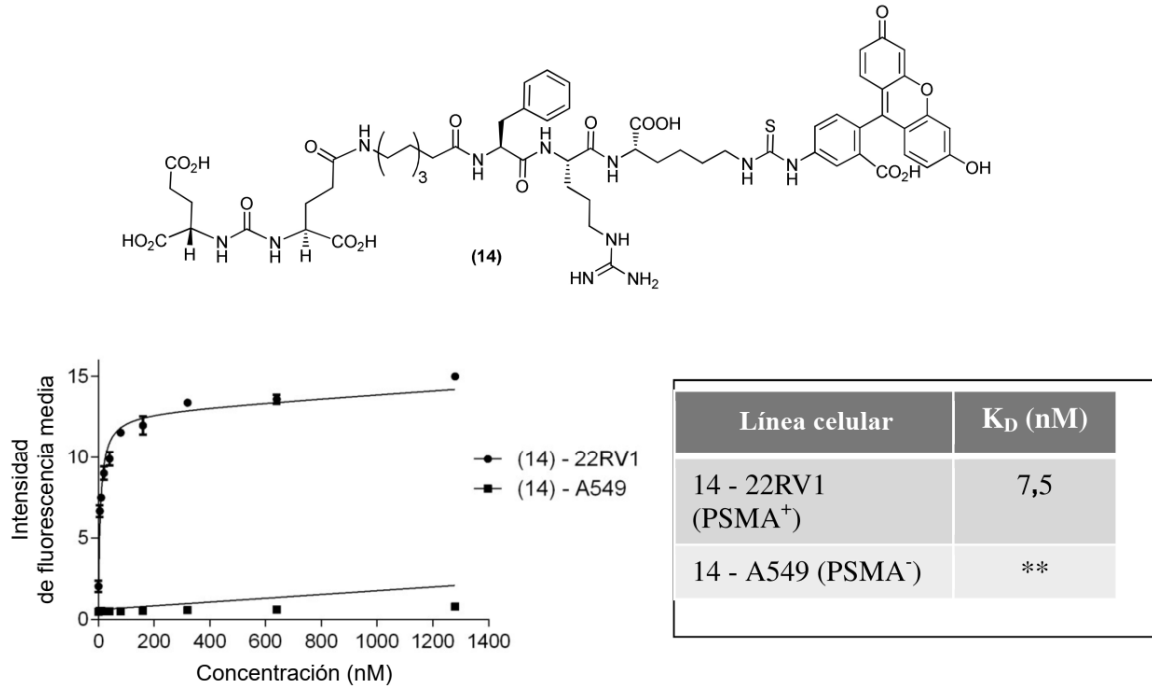


Figura 2: Estructura del conjugado DUPA-FITC (isotiocianato de fluoresceína) (14) dirigido al PSMA y su afinidad de unión (K_D) y especificidad sobre células de cáncer de próstata humano 22Rv1 positivas para el PSMA y sobre células de epitelio basal alveolar humano A549 negativas para el PSMA en cultivo. Se añadió DUPA-FITC disuelto en medio RPMI en las concentraciones indicadas a las células 22Rv1 o A549 en medio de cultivo RPMI y se dejaron en incubación durante 1 h a 37 °C. Después se retiró el medio, se lavó con medio reciente (3x) y se sustituyó por PBS (solución salina tamponada con fosfato). Las muestras se analizaron usando citometría de flujo. Las barras de error representan la DE ($n = 3$).

** no se une a las células A549

Figura 3

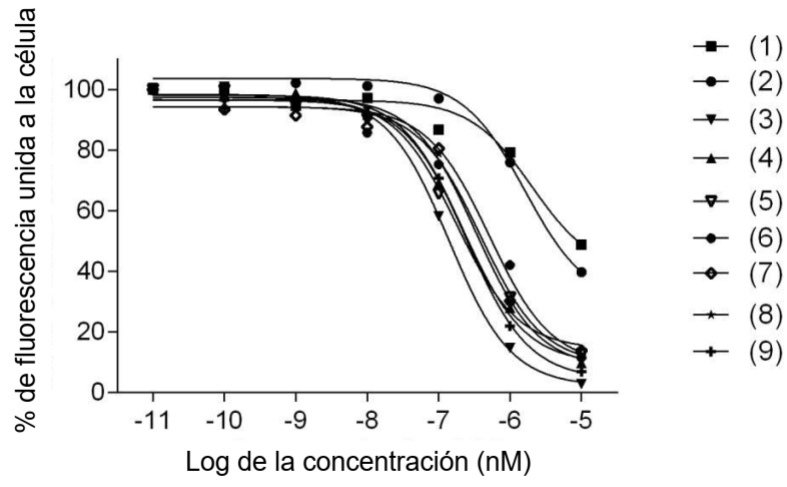


Figura 4

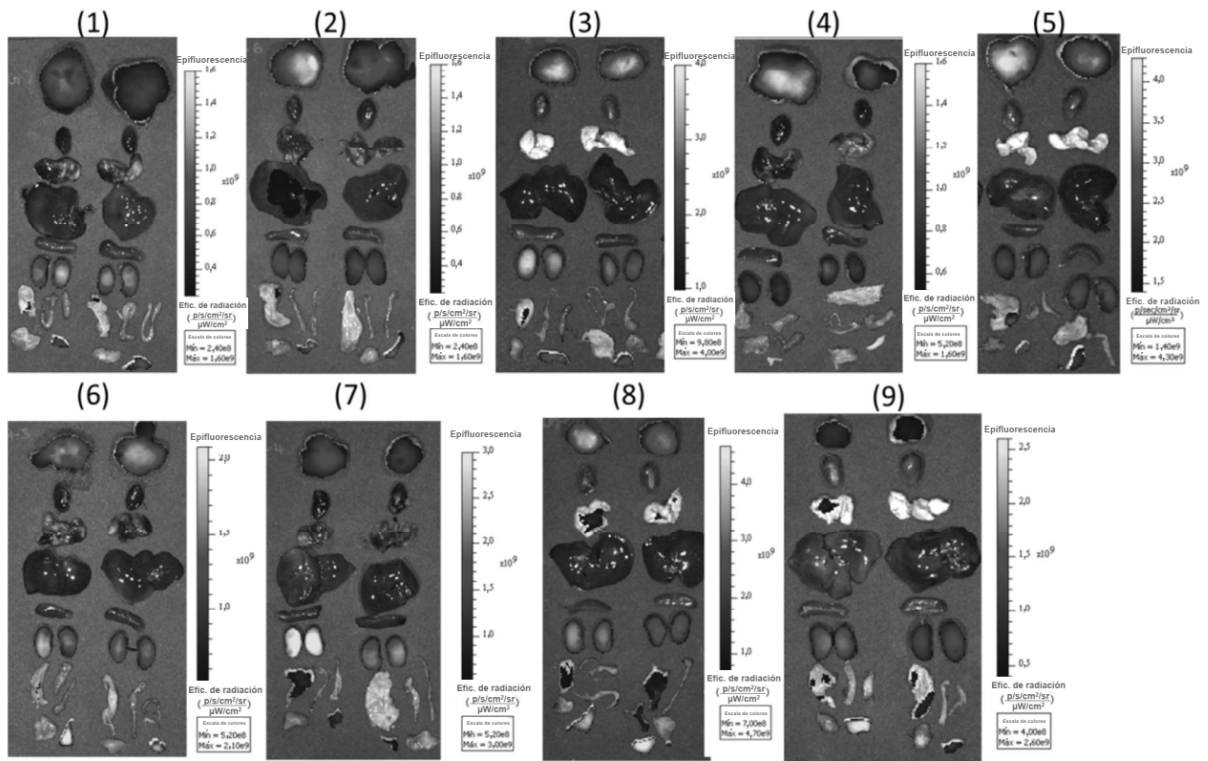


Figura 5

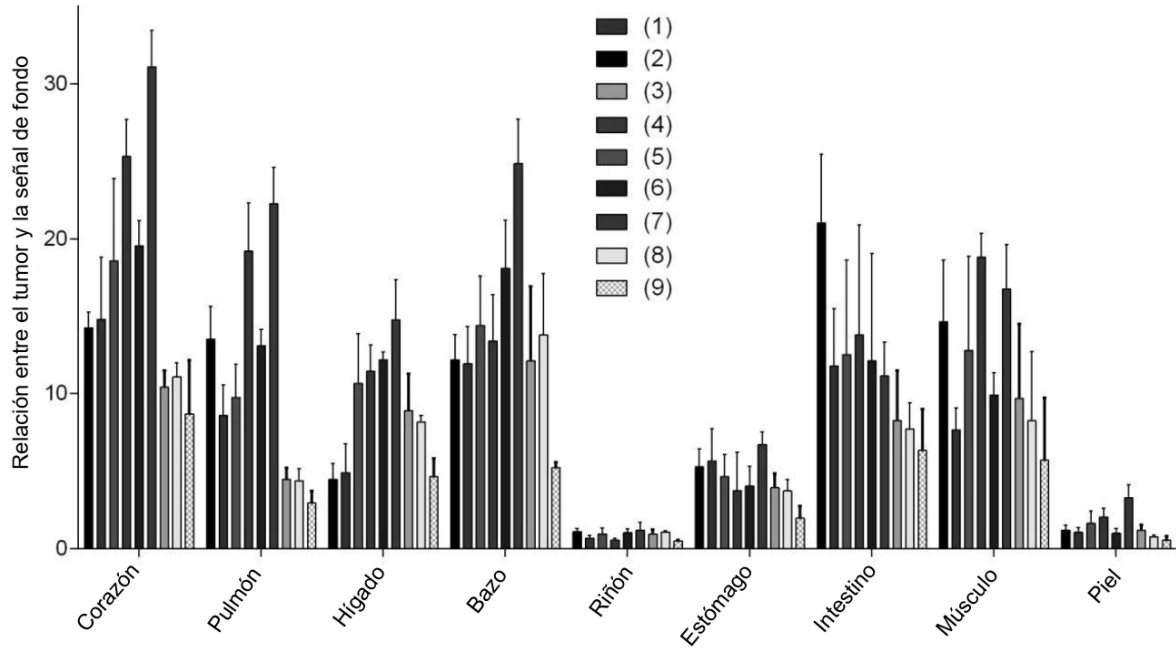


Figura 6

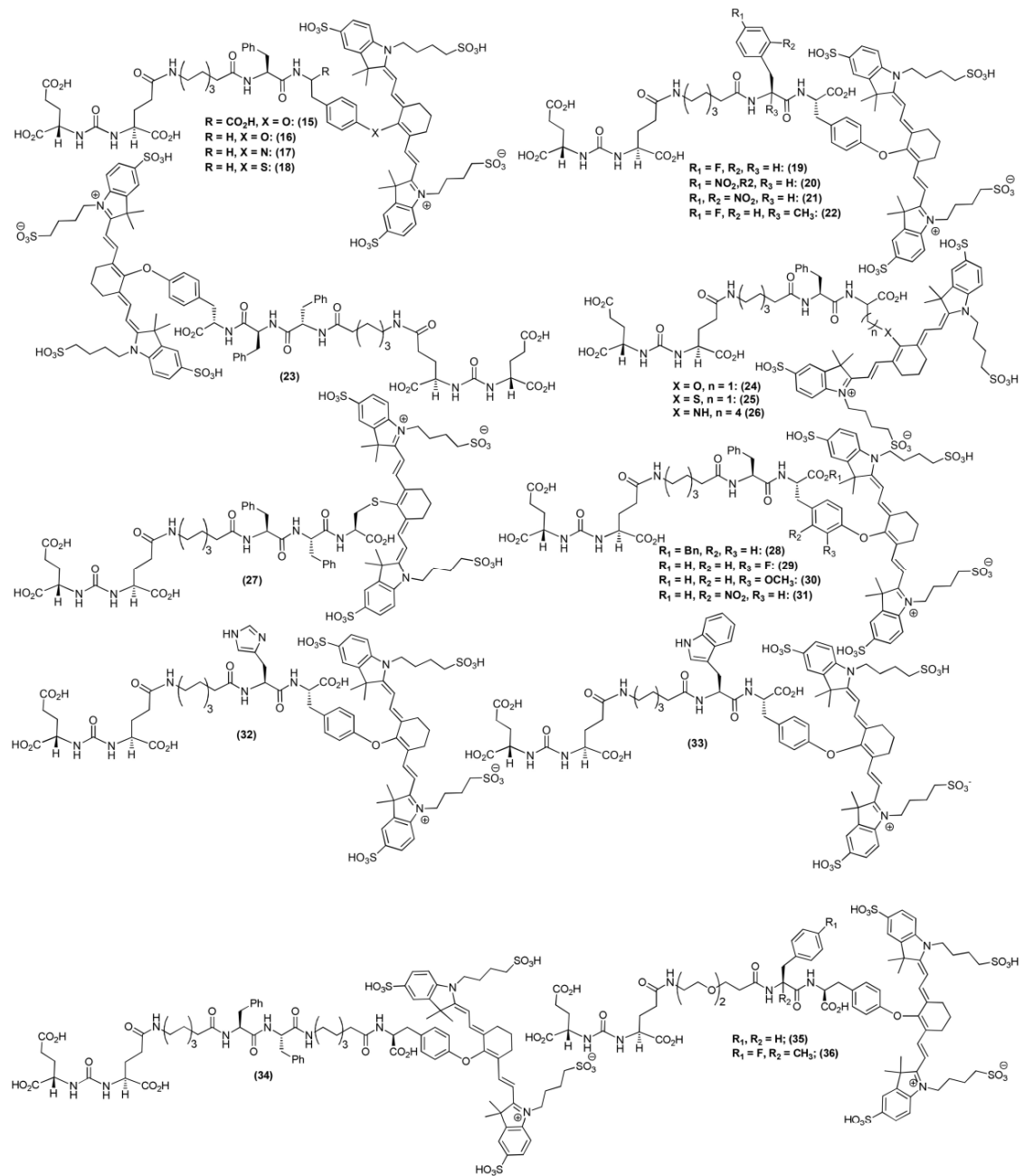


Figura 7

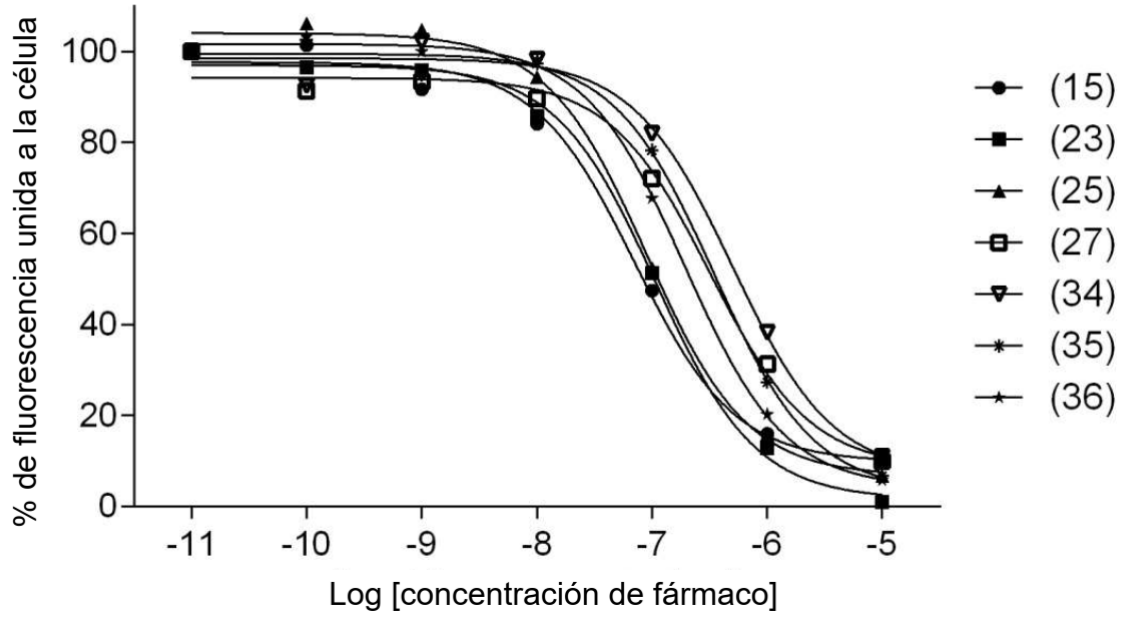


Figura 8

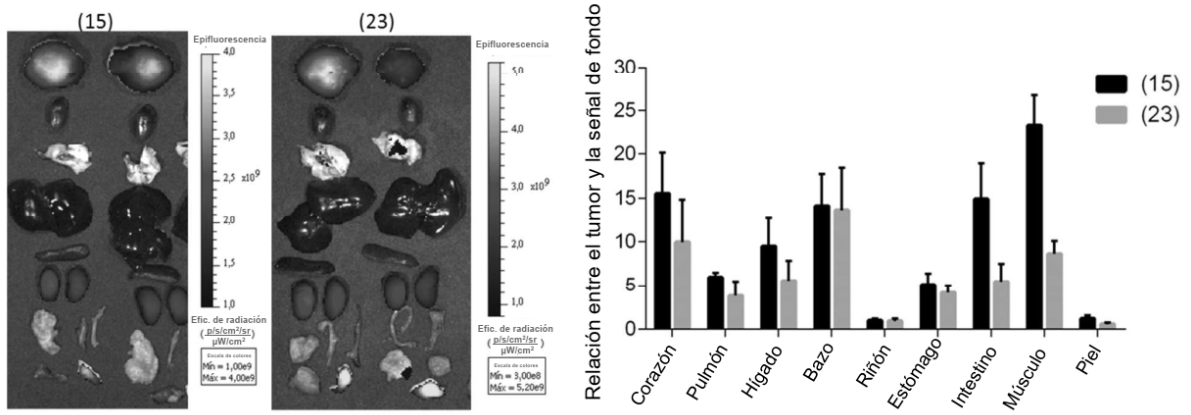


Figura 9

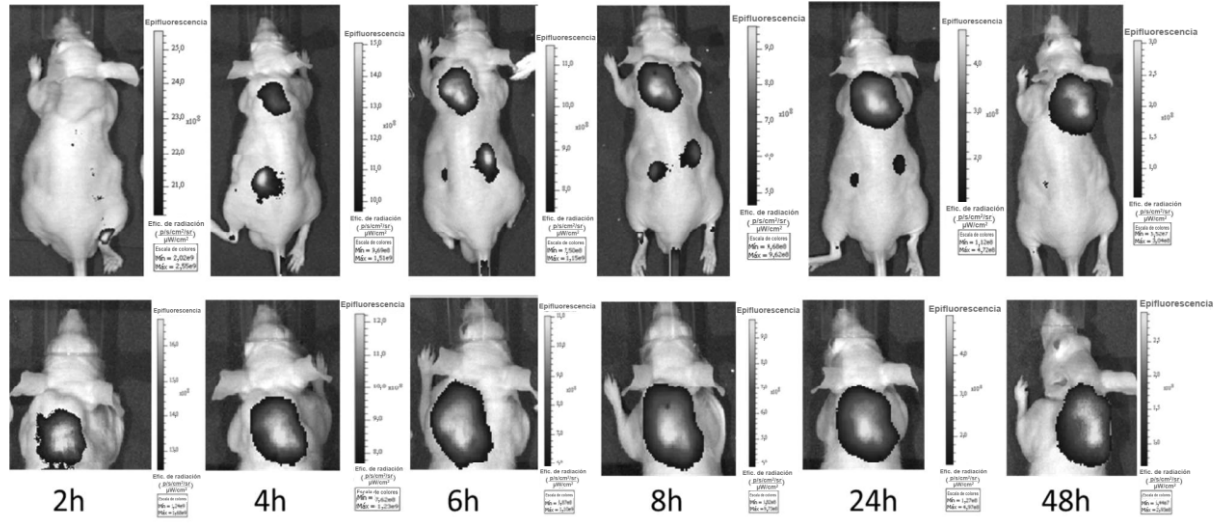


Figura 10

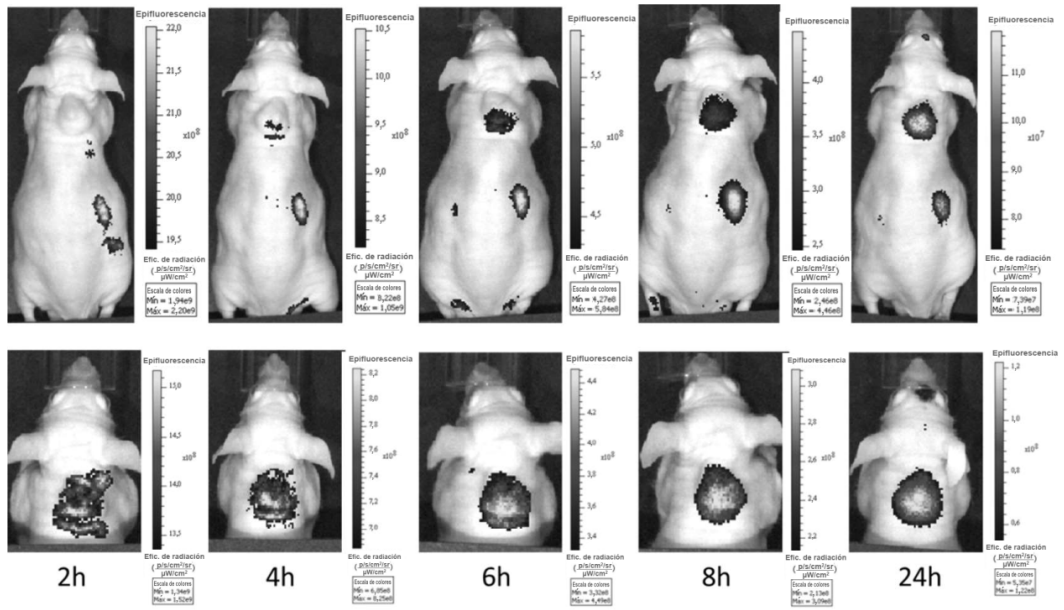


Figura 11

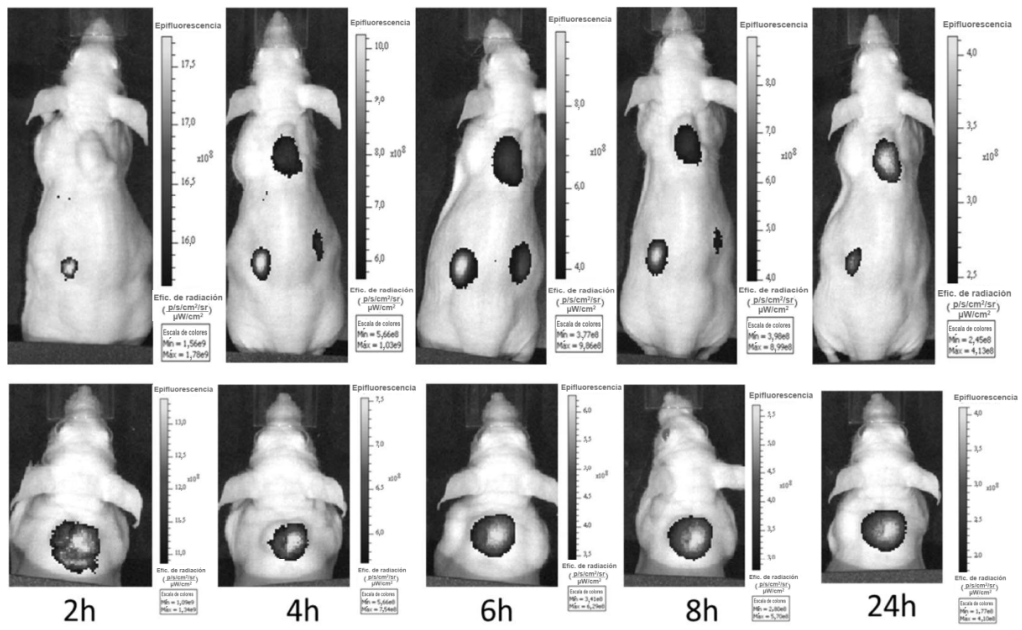


Figura 12

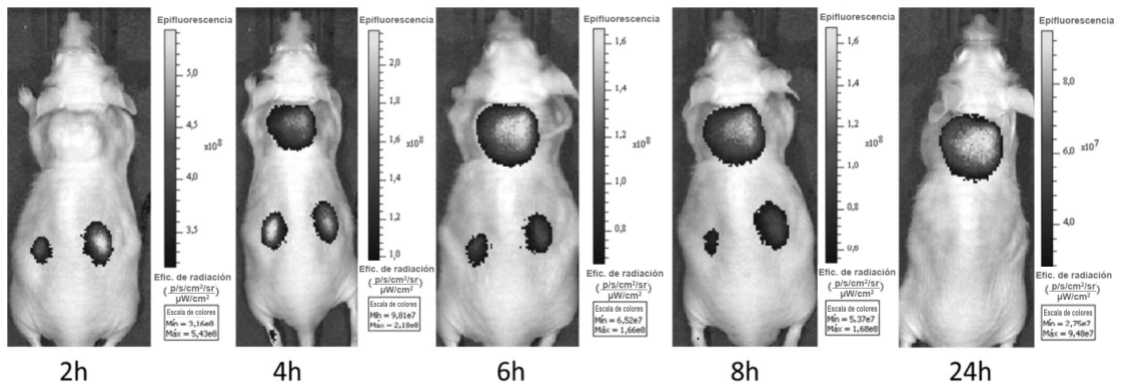


Figura 13

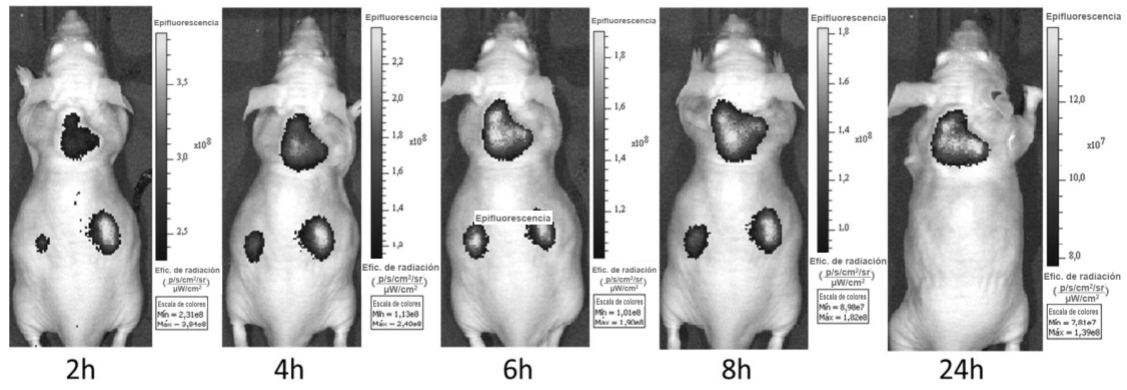


Figura 14

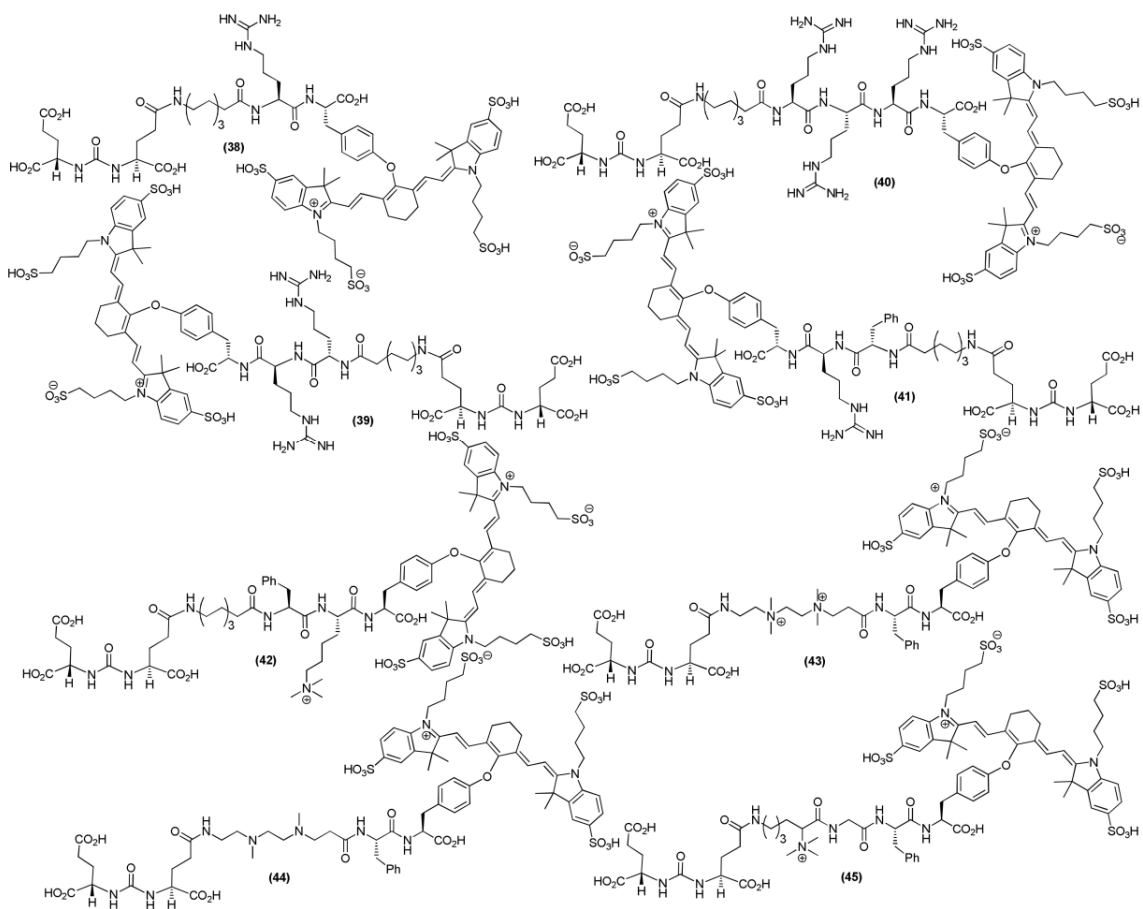
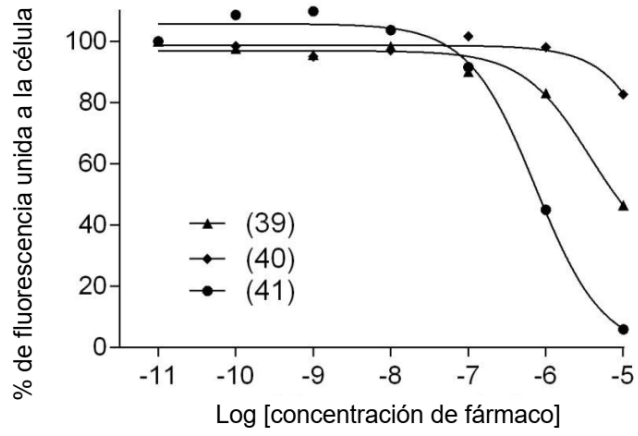


Figura 15

(a) Estudios *in vitro*

Compuesto	K_D (nM)
39	258,9
40	NA*
41	51,7

Figura 16

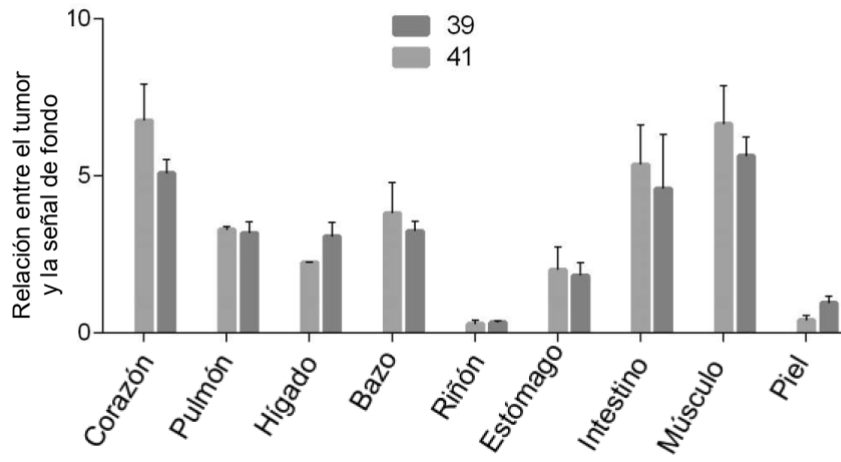


Figura 17

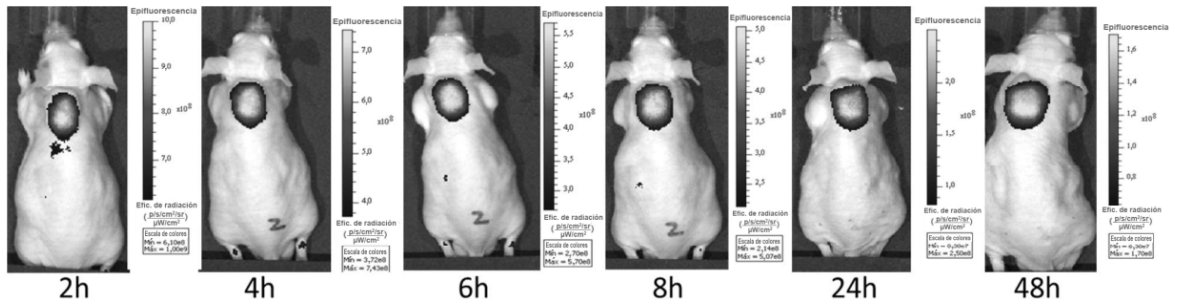


Figura 18

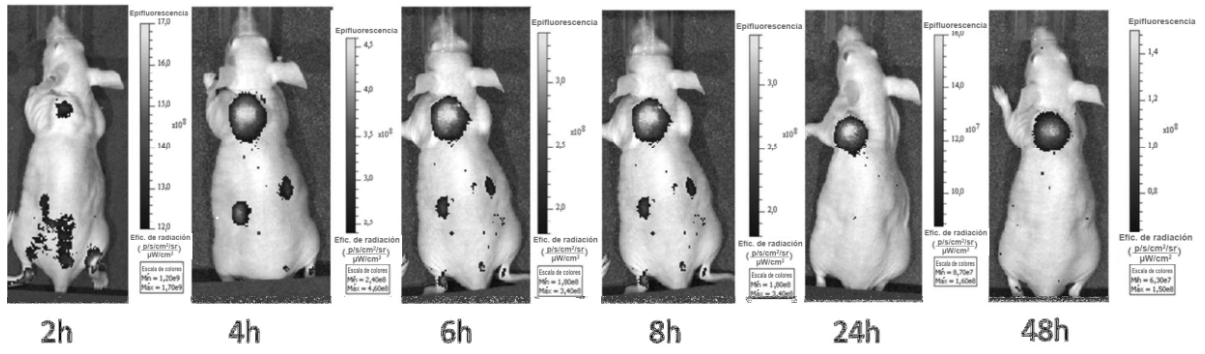


Figura 19

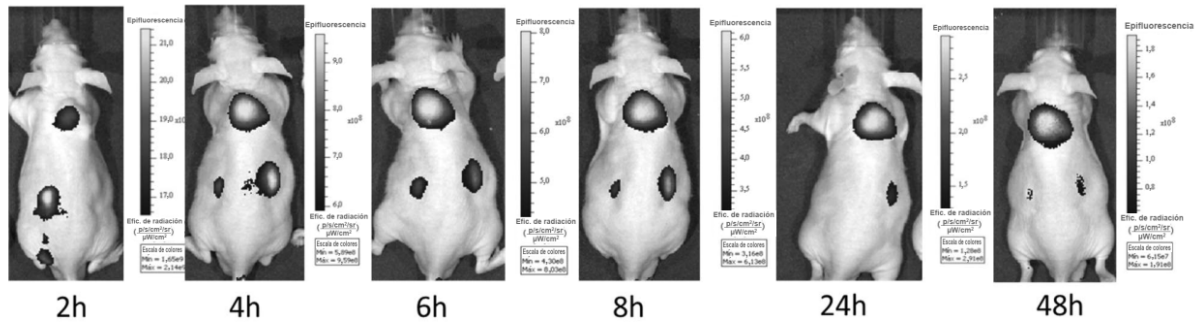


Figura 20

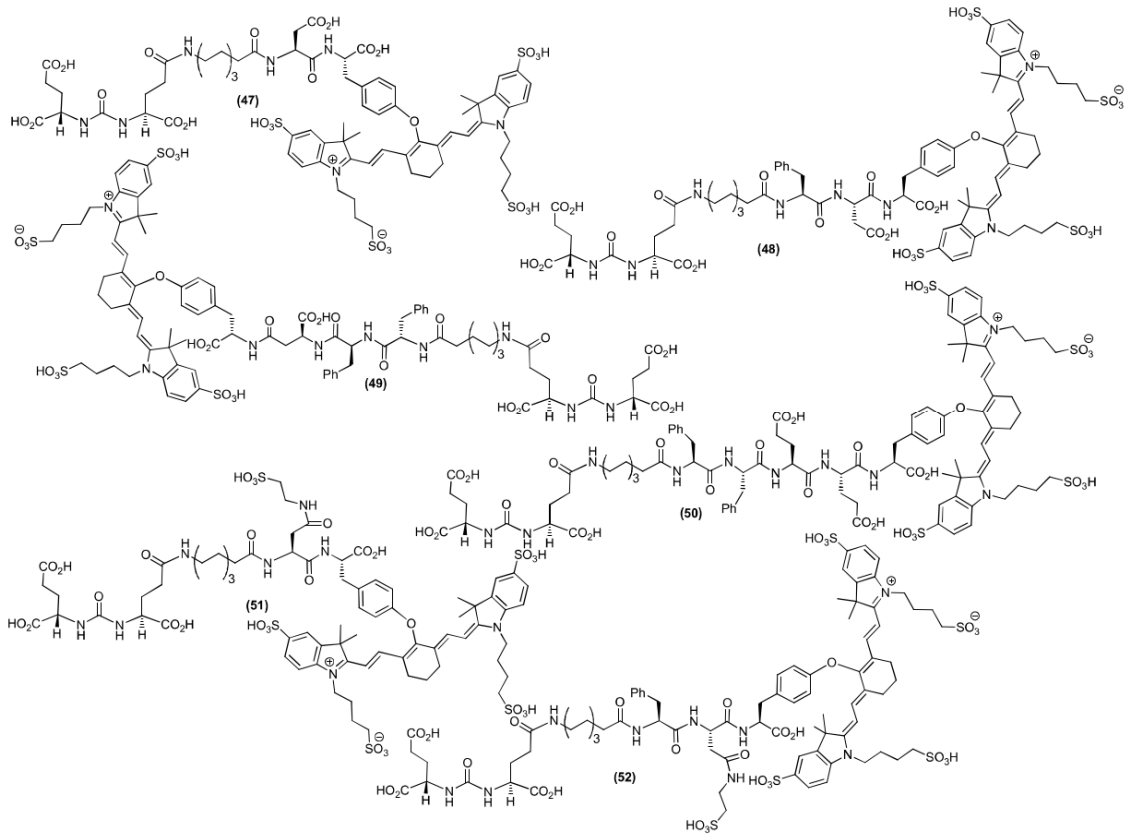


Figura 21

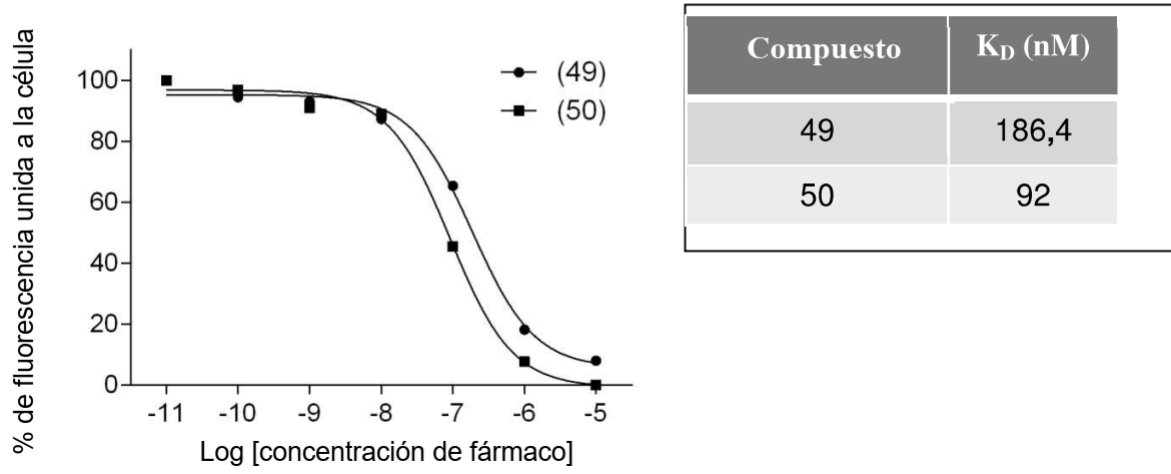


Figura 22

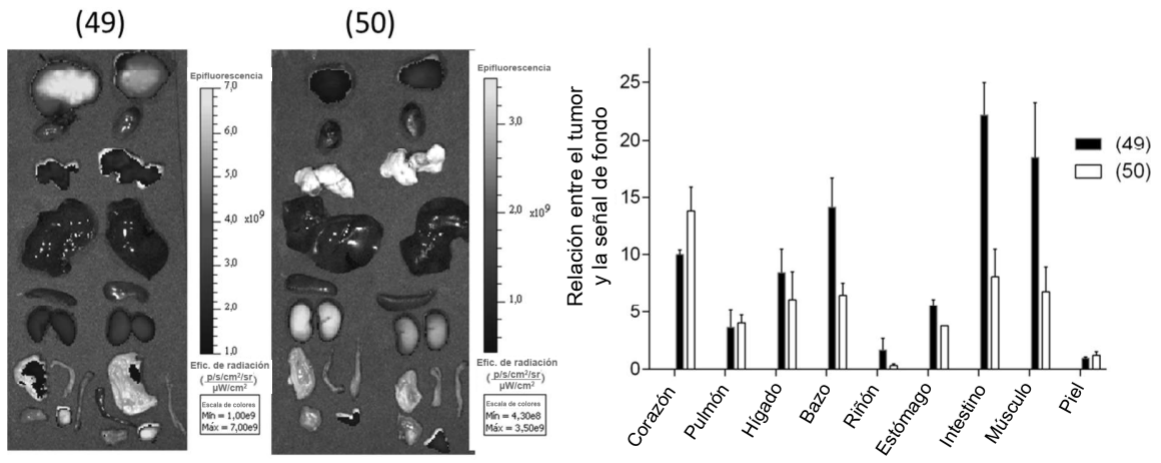


Figura 23

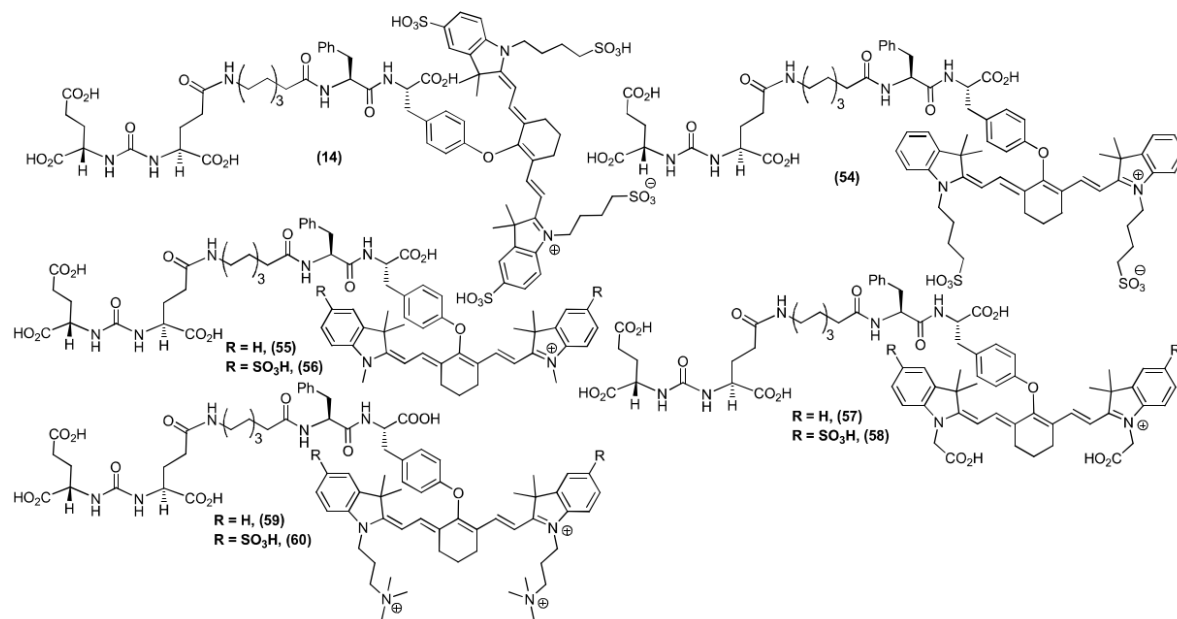


Figura 24

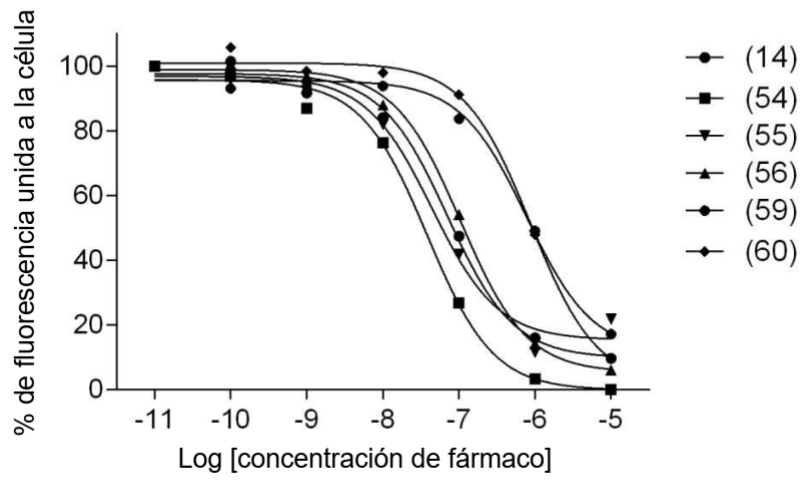


Figura 25

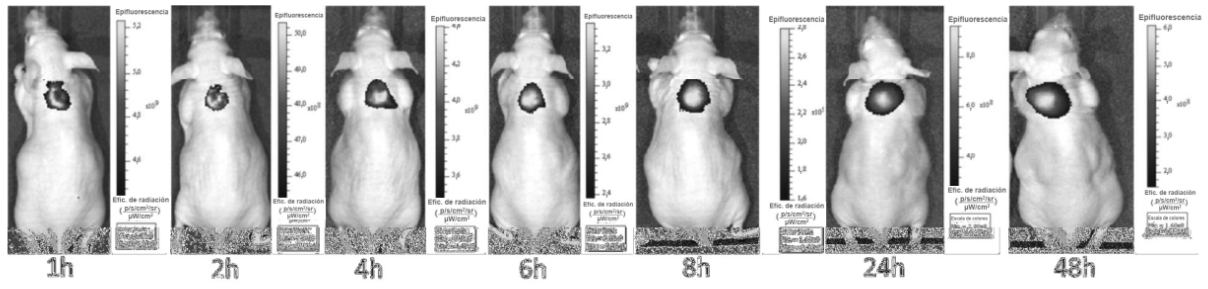


Figura 26

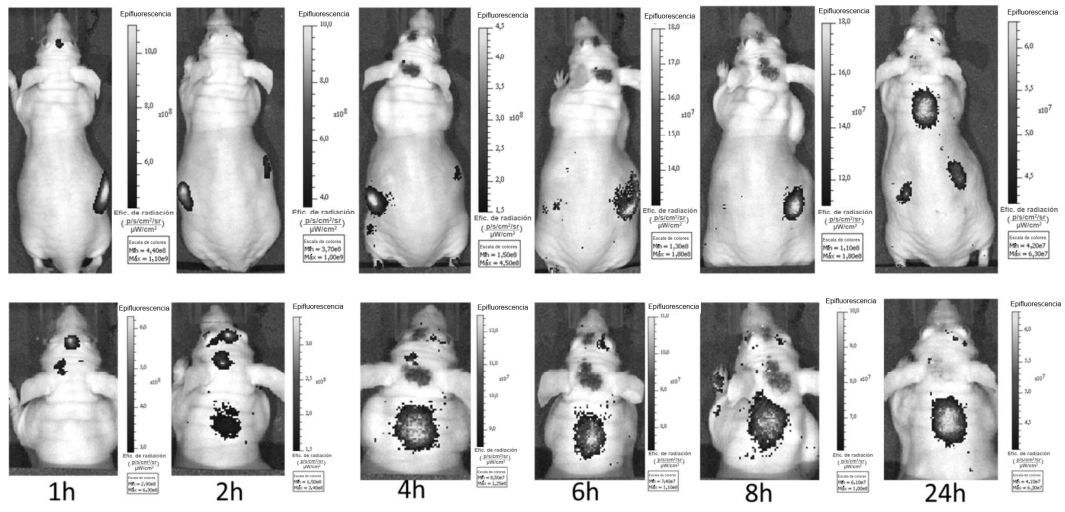


Figura 27

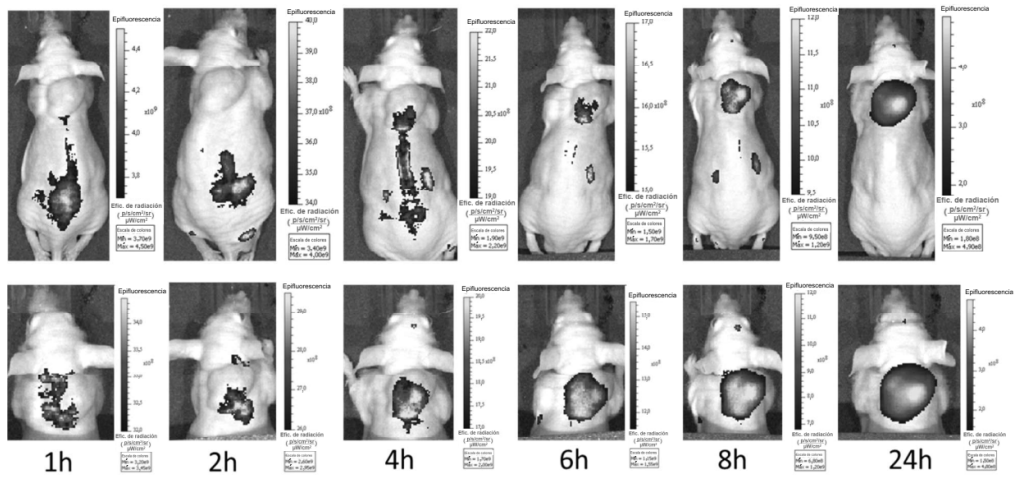


Figura 28

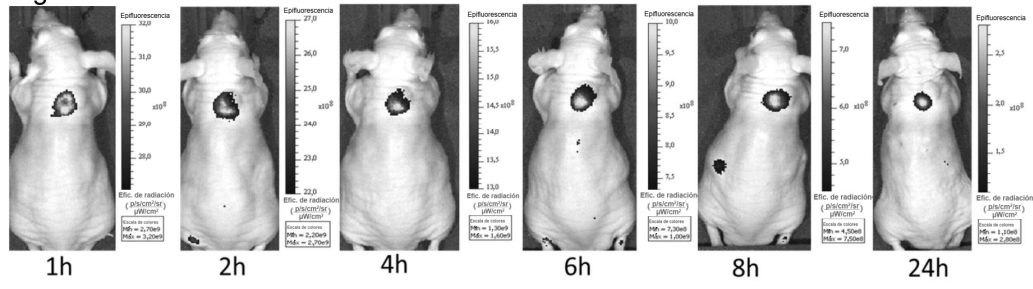


Figura 29

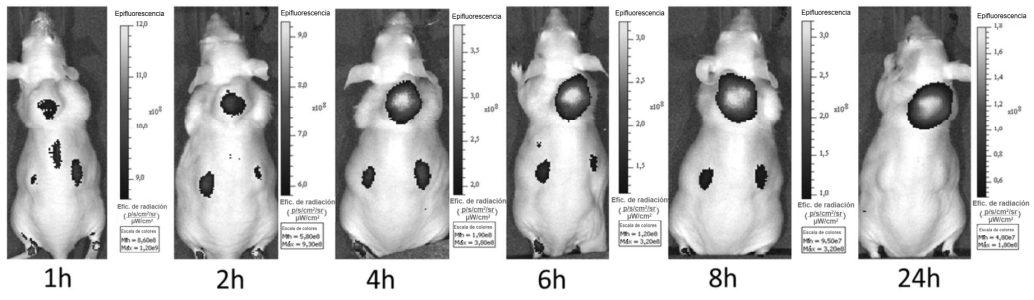


Figura 30

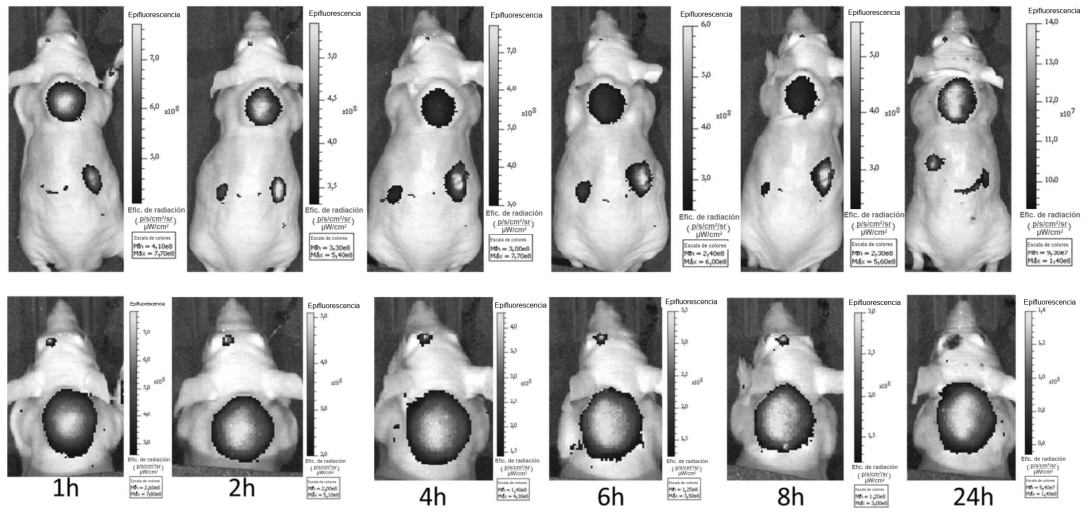


Figura 31

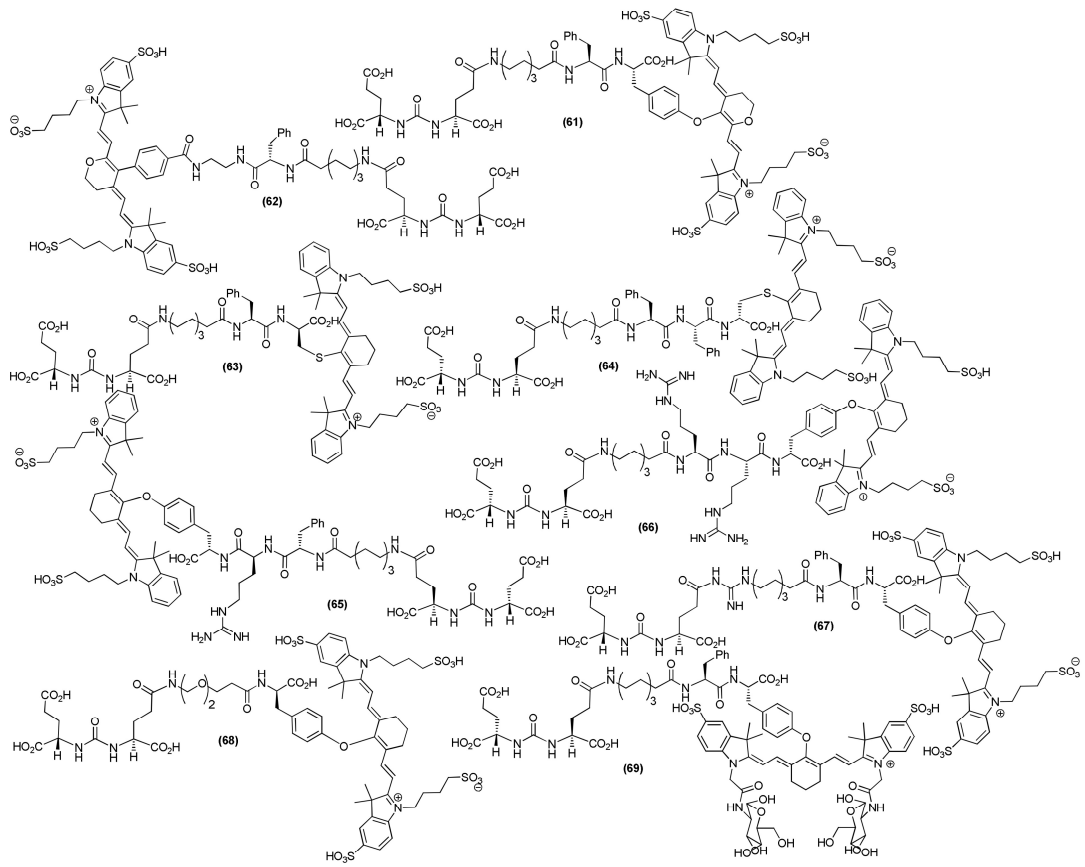


Figura 32

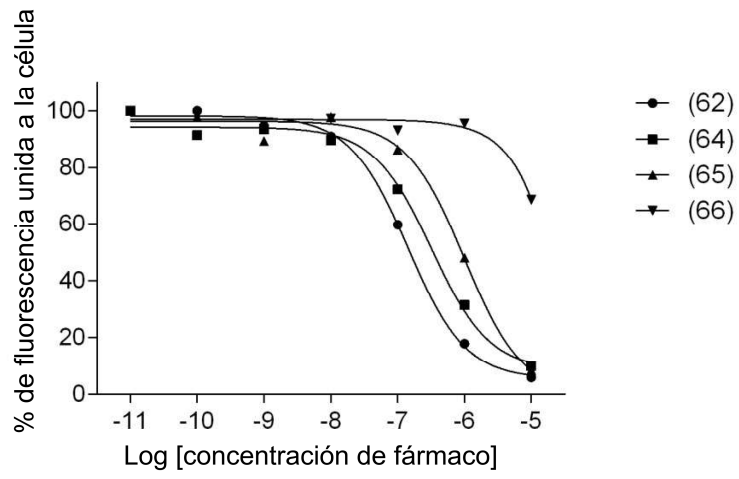


Figura 33

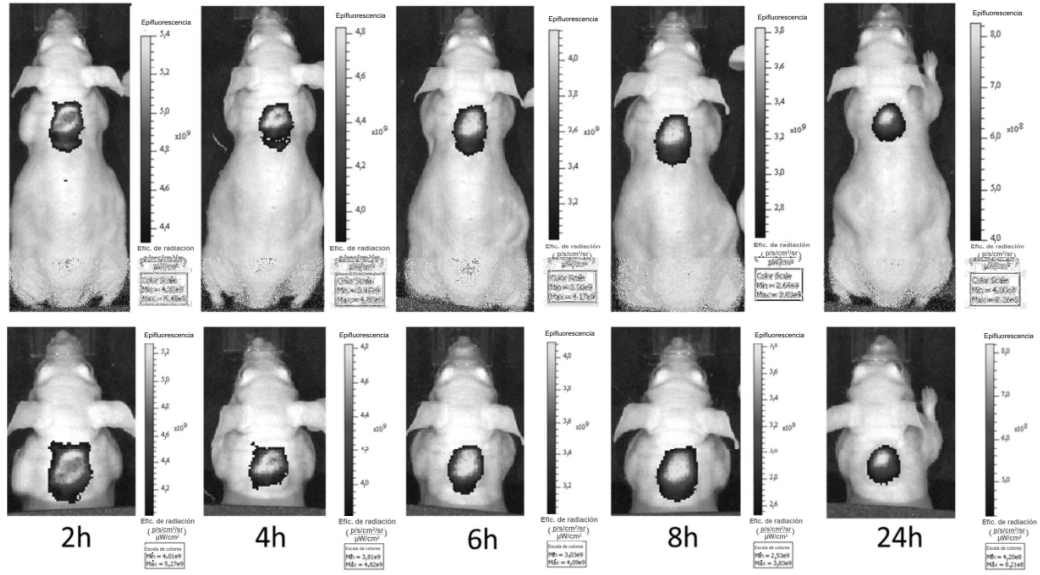


Figura 34

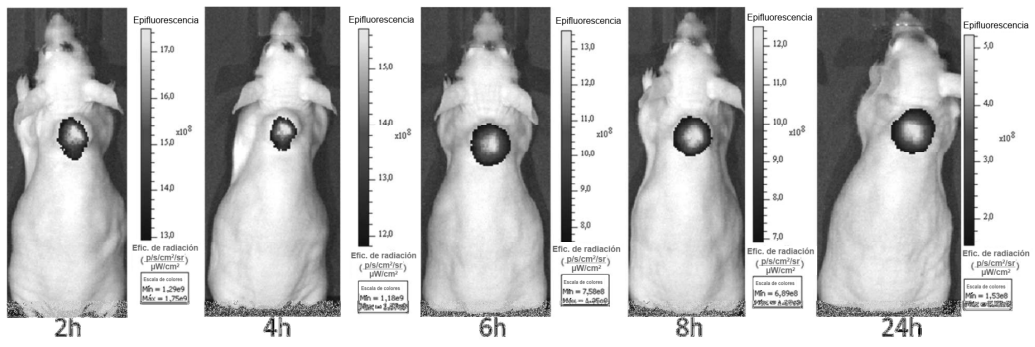


Figura 35

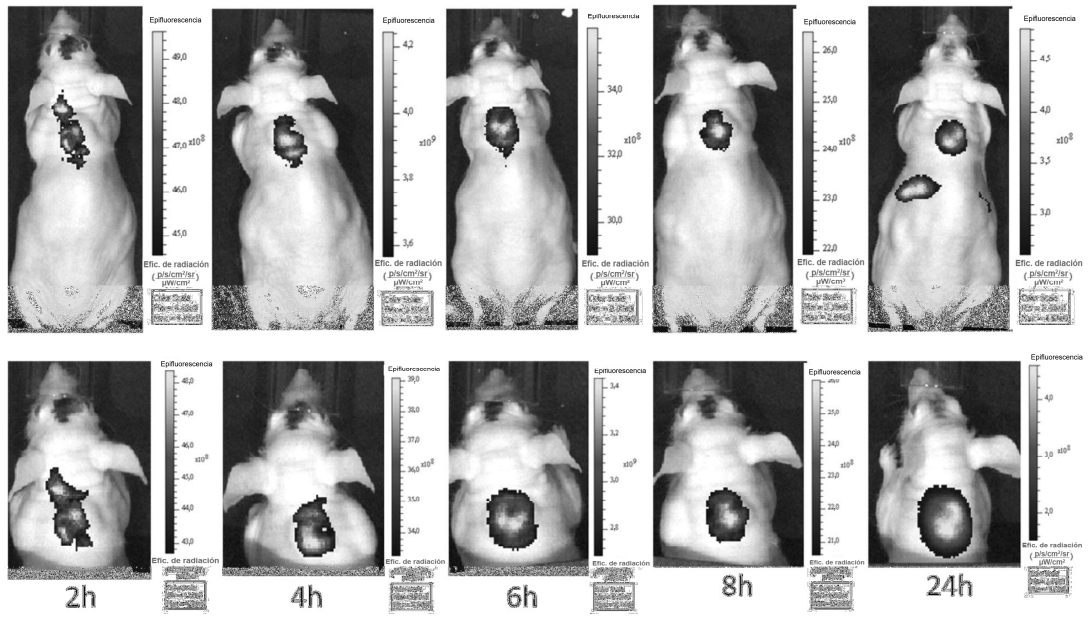


Figura 36

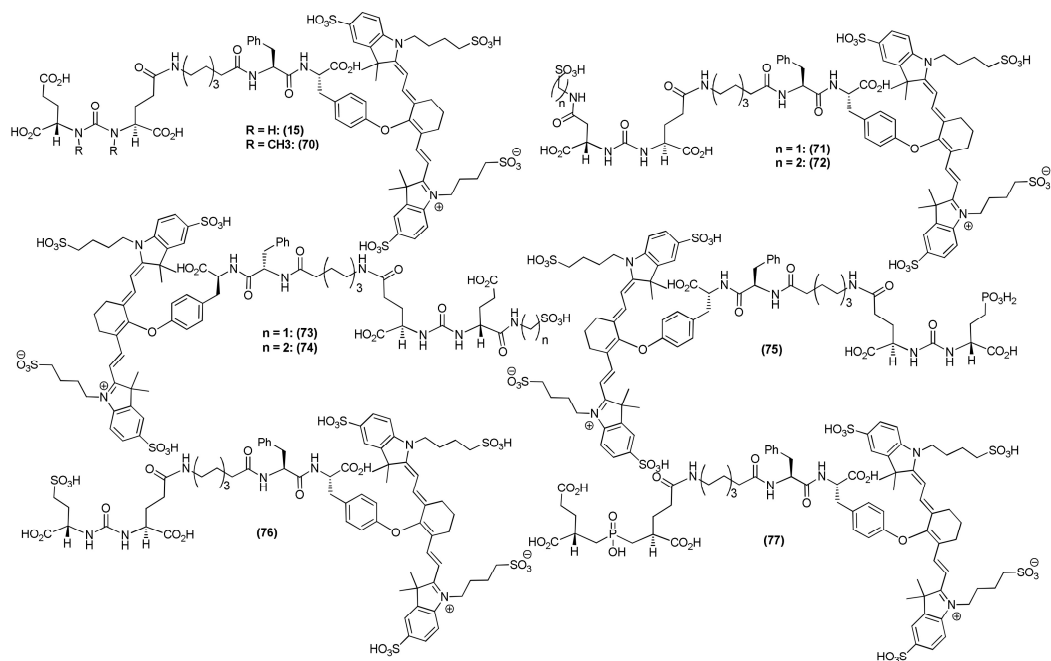


Figura 37

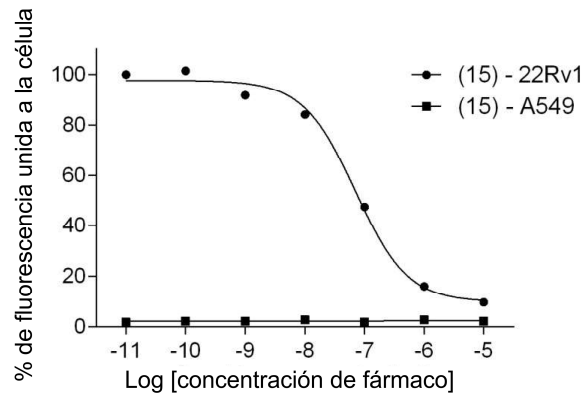


Figura 38

