



**República Federativa do Brasil**

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



\* B R P I O 7 1 8 7 0 0 B 1 \*

**(11) PI 0718700-9 B1**

**(22) Data do Depósito:** 07/11/2007

**(45) Data de Concessão:** 10/10/2023

**(54) Título:** HETERODÍMEROS DE ÁCIDO GLUTÂMICO E KIT

**(51) Int.Cl.:** A61K 51/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 05/01/2007 US 60/878,678; 08/11/2006 US 60/857,490.

**(73) Titular(es):** MOLECULAR INSIGHT PHARMACEUTICALS, INC..

**(72) Inventor(es):** CRAIG N. ZIMMERMAN; KEVIN P. MARESCA; JOHN W. BABICH.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2007083934 de 07/11/2007

**(87) Publicação PCT:** WO 2008/058192 de 15/05/2008

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 08/05/2009

**(57) Resumo:** HETERODÍMEROS DE ÁCIDO GLUTÂMICO, EKIT. A presente invenção se refere a compostos de Fórmula (Ia) em que R é uma C6-C12 arila substituída ou não-substituída, uma C6-C12 heteroarila substituída ou não-substituída, uma C1-C6 alquila substituída ou não-substituída ou -NR'R', Q é C(O), O, NR', S, S(O)2, C(O)2 (CH2)pY é C(O), O, NR', S, S(O)2, C(O)2 (CH2)pZ é H ou C1-C4 alquila, R' é H, C(O), S(O)2, C(O)2, uma C6-C12 arila substituída ou não-substituída, uma C6-C12 heteroarila substituída ou não-substituída ou uma C1-C6 alquila substituída ou não-substituída, quando substituídas, arila, heteroarila e alquila são substituídas com halogênio, C6-C12 heteroarila, -NR'R' ou COOZ, que têm propriedades diagnósticas e terapêuticas, tal como o tratamento e controle de câncer de próstata e outras doenças relacionadas à inibição de NAALADase. Radiorrótulos podem ser incorporados na estrutura por meio de uma variedade de grupos protetivos ligados na cadeia lateral de X amino por meio de uma ligação de átomo de carbono ou hetero.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"HETERODÍMEROS DE ÁCIDO GLUTÂMICO, E KIT".**

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

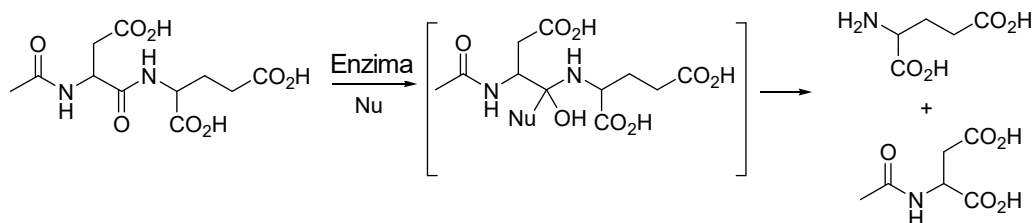
[001] Este pedido reivindica a prioridade para Pedido Provisório US 60/857,490, depositado em 8 de novembro de 2006, e Pedido Provisório US 60/878,678, depositado em 5 de janeiro de 2007, as descrições dos quais são incorporados aqui por referência em suas totalidades.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção se refere a pelo menos 1 milhão de homens que sofrem de câncer de próstata e estima-se que a doença atingirá um em seis homens dos Estados Unidos entre as idades de 60 e 80. Existem mais do que 300.000 novos casos de câncer de próstata diagnosticados a cada ano. O câncer de próstata afetará um em seis homens nos Estados Unidos, e a mortalidade da doença é a segunda apenas para o câncer de pulmão. Estima-se que \$2 bilhões é atualmente gasto mundialmente em terapia cirúrgica, de radiação, de fármaco e tratamentos minimamente invasivos, \$1 bilhão dos gastos nos Estados Unidos. Não existe atualmente nenhuma terapia eficaz para câncer de próstata independente de androgênio, metástico, recidivante. Novos agentes que permitirão rápida visualização de câncer de próstata e alveijamento específico para permitir radioterapia presente são necessários.

[003] Dipeptidase acídica alfa-ligada N-acilada (NAALADase), também conhecida como glutamato carboxipeptidase II (GCPII) é uma neuropeptidase que cliva N-acetilaspártico-glutamato (NAAG) em N-acetilaspártico e glutamato no sistema nervoso, veja abaixo, representando a clivagem hidrolítica de NAAG por NAALDase através do intermediário tetraedrico. A enzima é uma proteína tipo II da classe catalítica de metalopeptidases, contendo dois átomos de zinco no sítio

ativo.



[004] Independente de sua caracterização no sistema nervoso, uma forma de NAALADase mostrou-se ser expressa em níveis elevados em adenocarcinomas prostáticos humano e foi designado o antígeno de membrana específica de próstata (PSMA). O gene NAALADase/PSMA é conhecido produzir múltiplas formas de junção de mRNA e com base em evidência imunistoquímico anterior, assumiu-se que a próstata e cérebro humano expressaram diferentes isoformas da enzima.

[005] O antígeno de membrana específico de próstata humano (PSMA), também conhecido como folato hidrolase I (FOLH1), é uma transmembrana, glicoproteína de 750 aminoácidos tipo II que é primeiramente expressa em epitélio de próstata humano, porém é superregulado em câncer de próstata, incluindo doença metástica. PSMA é uma exopeptidase única com reatividade com respeito aos folatos poli-gama-glutamados, capaz de sequencialmente remover as poli-gama-glutamilas terminais. Visto que PSMA é expresso virtualmente por todos os cânceres de próstata e sua expressão é também aumentada em carcinomas pouco diferenciados, metásticos e refratários a hormônio, ele é um alvo muito atrativo para terapia e imageamento de próstata. Ligantes de desenvolvimento que interagem com PSMA e transportam radionuclídeos apropriados podem fornecer uma nova e promissora opção de alvejamento para a detecção, tratamento e controle de câncer de próstata.

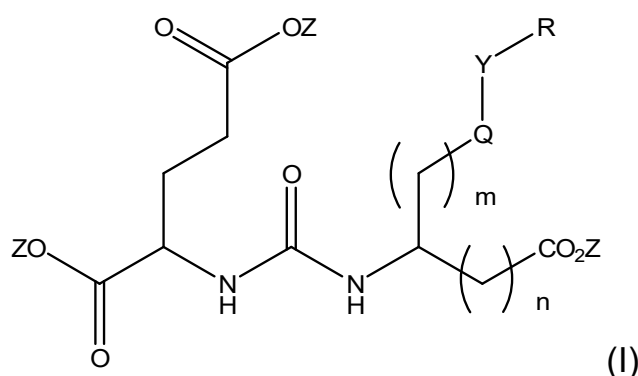
[006] A forma radioimunoconjugada do anticorpo monoclonal de anti-PSMA (mAb) 7E11, conhecida como a varredura PROSTASCINT, atualmente está sendo usada para diagnosticar metástase de câncer de

próstata e recorrência. Resultados promissores precoces de vários testes de Fase I e II têm utilizado PSMA como um alvo terapêutico. PROSTASCINT alveja o domínio intracelular de PSMA e é sabido ligar porções geralmente necróticas de tumor de próstata. <sup>14</sup> Mais recentemente, anticorpos monoclonais foram desenvolvidos que se ligam ao domínio extracelular de PSMA e foram radiorrotulados e mostraram acumular-se em modelos de tumor de próstata positivo de PSMA.

[007] Enquanto anticorpos monoclonais mantêm a promessa para terapia e detecção de tumor, houve sucessos clínicos limitados exceto de linfoma por causa de sua baixa permeabilidade em tumores sólidos. Miméticos de baixo peso molecular, com permeabilidade maior em tumores sólidos têm uma vantagem definida na obtenção de alto percentual por grama e uma alta porcentagem de ligação específica.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[008] Um aspecto da presente invenção se refere aos compostos de Fórmula (I)



em que R é uma C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> arila substituída ou não-substituída, um C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> heteroarila substituída ou não-substituída, uma C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquila substituída ou não-substituída ou -NR'R',

Q é C(O), O, NR', S, S(O)<sub>2</sub>, C(O)<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>

Y é C(O), O, NR', S, S(O)<sub>2</sub>, C(O)<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>

Z é H ou C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquila,

m é 0, 1, 2, 3, 4 ou 5

$n$  é 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6

$p$  é 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6

$R'$  é H, C(O), S(O)<sub>2</sub>, C(O)<sub>2</sub>, um C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> arila substituída ou não-substituída, uma C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> heteroarila substituída ou não-substituída ou uma C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquila substituída ou não-substituída,

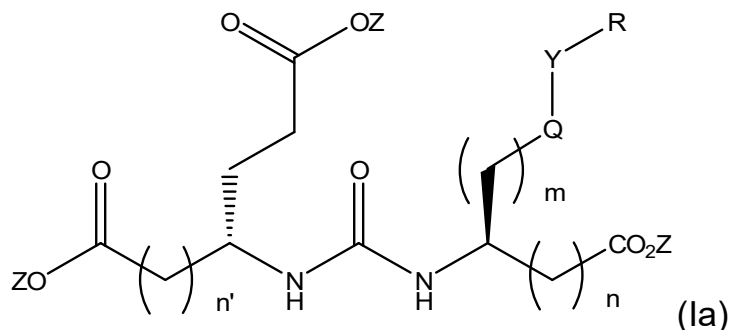
quando substituídas, arila, heteroarila e alquila são substituídas com halogênio, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> heteroarila, -NR'R' ou COOZ

também em que

(i) pelo menos um de R ou R' é uma C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> arila ou C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> heteroarila substituída com um halogênio ou

(ii) pelo menos um de R ou R' é uma C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> heteroarila ou um sal farmacologicamente aceitável do composto de Fórmula (I).

[009] Outro aspecto da presente invenção se refere aos compostos de Fórmula (Ia)



em que R é uma C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> arila substituída ou não-substituída, uma C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> heteroarila substituída ou não-substituída, uma C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquila substituída ou não-substituída ou -NR'R',

Q é C(O), O, NR', S, S(O)<sub>2</sub>, C(O)<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>

Y é C(O), O, NR', S, S(O)<sub>2</sub>, C(O)<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>

Z é H ou C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquila,

$m$  é 0, 1, 2, 3, 4 ou 5

$n$  0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6

$n'$  0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6

$p$  é 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6

R' é H, C(O), S(O)<sub>2</sub>, C(O)<sub>2</sub>, uma C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> arila substituída ou não-substituída, uma C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> heteroarila substituída ou não-substituída ou uma C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquila substituída ou não-substituída,

quando substituídas, arila, heteroarila e alquila são substituídas com halogênio, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> heteroarila, -NR'R' ou COOZ

também em que

(i) pelo menos um de R ou R' é uma C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> arila ou C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> heteroarila substituída com pelo menos um halogênio ou

(ii) pelo menos um de R ou R' é uma C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> heteroarila substituída ou não-substituída

ou um sal farmacologicamente aceitável do composto de Fórmula (I).

[0010] Em uma modalidade dos compostos de Fórmulas (I), (Ia), (II) ou (IIa) n é 0 ou 1 e n' é 0 ou 1.

[0011] A presente invenção também se refere às porções de ligação de glutamato-ureia-lisina e seu uso em tratamento diagnóstico e terapêutico. Em uma modalidade, análogos com base em ureia descritos aqui são heterodímeros de glutamato-ureia- $\alpha$  ou  $\beta$ -aminoácido acoplados por meio dos grupos  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> ou  $\beta$ -NH<sub>2</sub>. Radiorrótulos podem ser incorporados na estrutura por meio de uma variedade de grupos protéticos ligados na cadeia lateral de X amino por meio de uma ligação de átomo de carbono ou hetero. Os compostos da presente invenção podem encontrar uso como agentes de alveamento e agentes diagnósticos e terapêuticos para o tratamento e controle de câncer de próstata e outras doenças relacionadas à inibição de NAALADase.

[0012] Porções químicas adequadas, definições de porções químicas, excipientes e métodos e modelos de administração podem ser encontrados nos Pedidos Publicados dos Estados Unidos n<sup>os</sup>: 2004/0054190 e 2004/0002478 e Pedidos Internacionais n<sup>os</sup>: WO 02/22627 e WO 03/060523, que são incorporados aqui por referência

em suas totalidades.

### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0013] As Figuras 1A-1C são cromatogramas de HPLC respectivamente da coinjeção do TC-99m-glu-ureia-DpK (Tc-99m-MIP 1008), do análogo de rênio, e dos complexos de diéster de rênio.

[0014] As Figuras 2A-2D mostram a estabilidade do complexo de Tc-99m de Glu-ureia-DpK (Tc-99m-MIP 1008) a 37°C em respectivamente PBS pH 7,2, 0,1 M Cisteína em PBS, 0,1 M de DTPA em PBS, e 5% de soro de camundongo em PBS durante 6 horas.

[0015] As Figuras 3A-3B são respectivos cromatogramas de HPLC de reação crua de N-[N-[(S)-1,3-dicarboxipropil]carbamoil]-S-3-iodo-L-tirosina (I-131 DCIT) Figura 3A, topo, purificados em 2 horas, Figura 3B, centro e em 2 dias Figura 3C, base.

[0016] As Figuras 4A-4D são cromatogramas de radio-HPLC de I-131 MIP 1072 purificados; em 3 dias em A) DMSO. B) 3% de genstisato-6% de Ascorbato/Ácido ascórbico, C) PBS, pH = 7,2, D) 10% de Etanol em Salina a 37°C. Como acima mostrado, o I-131-1072 (pico 12 minutos) permaneceu estável durante todo o experimento.

[0017] A Figura 5 mostra I-123 DCIT especificamente ligado às células LnCap e não às células PC3 (grupo à esquerda) como é evidente pelas contas removíveis por composto não radiorrotulado (grupo ao centro) ou PMPA (grupo à direita) em células LnCap. Os histogramas mostram a média  $\pm$  SEM, cada experimento foi realizado em duplicata.

[0018] A Figura 6 é a Análise de *Scatchard* no Ensaio de Ligação Celular de PSMA com ácido 2-{3-[1-carbóxi-2-(4-hidróxi-fenil)-etil]-ureído}-pentanodióico frio (DCT).

[0019] A Figura 7 mostra avaliações biológicas de compostos selecionados nas células LnCap positivas de PSMA.

[0020] A Figura 8 mostra as avaliações biológicas de compostos de

chumbo nas células LnCap positivas de PSMA.

[0021] A Figura 9 mostra a Análise de Scatchard no Ensaio de Ligação Celular de PSMA com MIP1072.

[0022] A Figura 10 mostra a internalização de I-131-MIP1072.

[0023] As Figuras 11A e 11B respectivamente mostram a estabilidade de I-131 MIP-1072 versus DCT e Fenacetina em microssomas de rato durante 60 minutos.

[0024] A Figura 12 mostra a biodistribuição de tecido do I-131 MIP1072 em camundongos tumorados de xenoenxerto.

[0025] A Figura 13 mostra a inibição de Atividade de NAALADase de lisados celulares de LNCaP.

[0026] A Figura 14 mostra a inibição de Atividade de NAALADase de lisados celulares de LNCaP.

[0027] A Figura 15 mostra a inibição de Atividade de NAALADase de lisados celulares de LNCaP.

[0028] A Figura 16 mostra a capacidade de compostos testes inibirem a ligação de um inibidor de NAALADase conhecido, 131I-DCIT, ao PSMA em células LnCap foi examinada. As células foram incubadas com várias concentrações de compostos teste e 131I-DCIT durante 1 hora, em seguida lavadas e contadas para determinar os valores de IC<sub>50</sub>.

[0029] A Figura 17 é análise de ligação direta de MIP-1072. <sup>123</sup>I-MIP-1072 (3 nM, >1,000 mCi/ μmol) foi incubado com Células LnCap positivas de PSMA ou células PC3 negativas de PSMA (300,000 células/cavidades), tanto na ausência quanto na presença de 10 μM de MIP-1072 não reativo ou 10 μM de um inibidor de PSMA específico (PMPA).

[0030] A Figura 18 mostra a análise de ligação de saturação de <sup>123</sup>I-MIP-1072 em células LNCaP.

[0031] A Figura 19 mostra a internalização de <sup>123</sup>I-MIP-1072.

[0032] A Figura 20 mostra a captação de  $^{123}\text{I}$ -MIP-1072 em camundongos transportando xenoenxerto de LNCaP. A biodistribuição de tecido de  $^{123}\text{I}$ -MIP-1072 (2  $\mu\text{Ci}$ /camundongo,  $>1,000$  mCi/ $\mu\text{mol}$ ) foi avaliada em tecidos selecionados de camundongos nus transportando tumor de LnCap (PSMA positivo). Os resultados são expressos como o percentual da dose injetada por grama dos tecidos selecionados (%ID/g).

[0033] A Figura 21 captação de  $^{123}\text{I}$ -MIP-1072 em camundongos transportando xenoenxerto de LnCap e PC3. A biodistribuição de tecido de  $^{123}\text{I}$ -MIP-1072 (2  $\mu\text{Ci}$ /camundongo,  $>1,000$  mCi/ $\mu\text{mol}$ ) foi avaliada em tecidos selecionados de camundongos nus transportando tumor de LnCap (PSMA positivo) e PC3 (PSMA negativo) com pré-tratamento (Bloqueado) ou sem (Normal) com 50 mg/kg PMPA.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

##### Definições

[0034] "Sal farmacologicamente aceitável" se refere àqueles sais que retêm as propriedades e eficácia biológica das bases livres e são obtidos por reação com ácidos inorgânicos tais como ácido hidrocloreto, ácido hidrobromico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido metanossulfônico, ácido etanossulfônico, ácido p-toluenossulfônico, ácido salicílico e similares.

[0035] "Alquila" se refere a um hidrocarboneto de alifático saturado cadeia linear, ramificada ou cíclica. Grupos alquila típicos incluem metila, etila, propila, isopropila, butila, isobutila, butila terciária, pentila, hexila e similares. O grupo alquila pode ser opcionalmente substituído com um ou mais substituintes selecionados do grupo que consiste em hidroxila, ciano, ou alcóxi. Quando o grupo alquila for um substituinte de R', ele será uma alquila inferior de 1 a 6 carbonos, mais preferivelmente 1 a 4 carbonos.

[0036] "Arla" se refere a um grupo aromático que tem pelo menos

um anel tendo um sistema pi elétron conjugado e inclui grupo arila carbocíclica, arila heterocíclica e biarila. o grupo arila pode ser opcionalmente substituído com um ou mais substituintes selecionado do grupo que consiste em halogênio, triálometila, hidroxila, SH, OH, NO<sub>2</sub>, amina, tioéter, ciano, alcóxi, alquila, e amino. Exemplos de grupos arila incluem grupos fenila, naftila e antracila. Grupos fenila e fenila substituída são preferidos.

[0037] "Heteroarila" se refere a um grupo arila tendo de 1 a 3 heteroátomos como átomos de anel, o restante dos átomos de anel sendo carbono. Heteroátomos incluem oxigênio, enxofre e nitrogênio. Desse modo, grupos arila heterocíclica grupos incluem furanila, tienila, piridila, pirrolila, alquil pirrolo N-inferior, pirimidila, pirazinila, imidazolila e similares.

#### Síntese

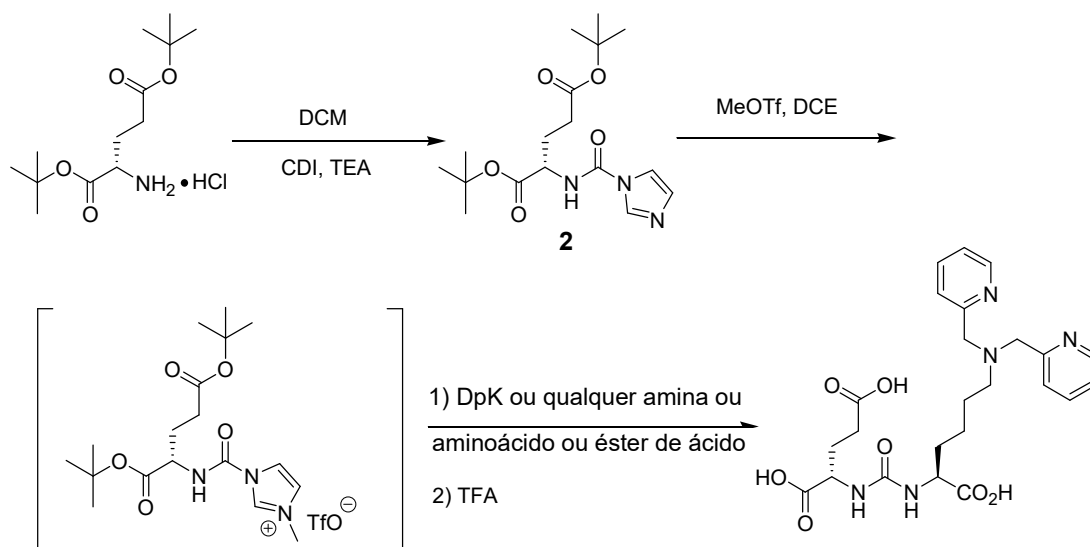
[0038] Todas as reações foram realizadas em artigos de vidro secos sob uma atmosfera de argônio a menos que de outro modo mencionado. As reações foram purificadas por cromatografia de coluna, sob pressão média usando um Biotage SP4 ou por cromatografia líquida de pressão elevada preparativa.

[0039] <sup>1</sup>H RMN foi registrado em um instrumento Bruker 400 MHz. Os são reportados como ppm  $\delta$  e são referentes às ressonâncias de solvente em CDCl<sub>3</sub>, DMSO-*d*<sub>6</sub> ou metanol-*d*<sub>4</sub>. Todos os solventes foram adquiridos de Sigma-Aldrich. Os reagentes foram adquiridos de Sigma Aldrich, Bachem, Akaal, Fisher, Alfa Aesar, Acros e Anaspec. As seguintes abreviações são usadas cloreto de metileno (DCM), acetato de etila (EA), hexanos (Hex), dicloroetano (DCE), dimetil formamida (DMF), ácido trifluoroacético (TFA), tetraidrofurano (THF), carbonildiimidazol (CDI), dimetilaminodiridina (DMAP), trietilamina (TEA), trifluorometanossulfonato de metila (MeOTf), ácido (S)-2-amino-6-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-hexanóico (dpK), ácido glutâmico (Glu),

diisopropiletilamina (DIEA), benziloxycarbonila (CBZ).

### Síntese de Intermediários

[0040] Os seguintes compostos foram todos preparados em produções totais variando de 20-40% seguindo a rotina descrita no Esquema 1. A primeira etapa, realizada a 0°C sob condições inertes usou o éster di-*t*-butílico de ácido glutâmico com CDI na presença de base para formar o derivado de Glu-ureia-imidazol intermediário **2**. Este intermediário foi ativado com MeOTf sob condições básicas para fornecer o imidazol metilado **3**, que sob condições inertes reagiram facilmente com aminas. Os grupos de proteção de éster *tert*-butílico foram removidos usando 20% de TFA em DCM durante 1 a 4 horas em temperatura ambiente. Na conclusão da desproteção, as reações foram concentradas em um evaporador giratório ou dilatadas secas com nitrogênio e purificadas em coluna de sílica ou recristalizadas. Os produtos finais foram testados *in vitro* e *in vivo*.

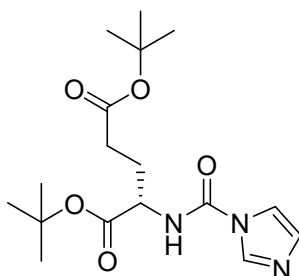


Esquema 1. Séries de reação gerais para a síntese de compostos PSMA.

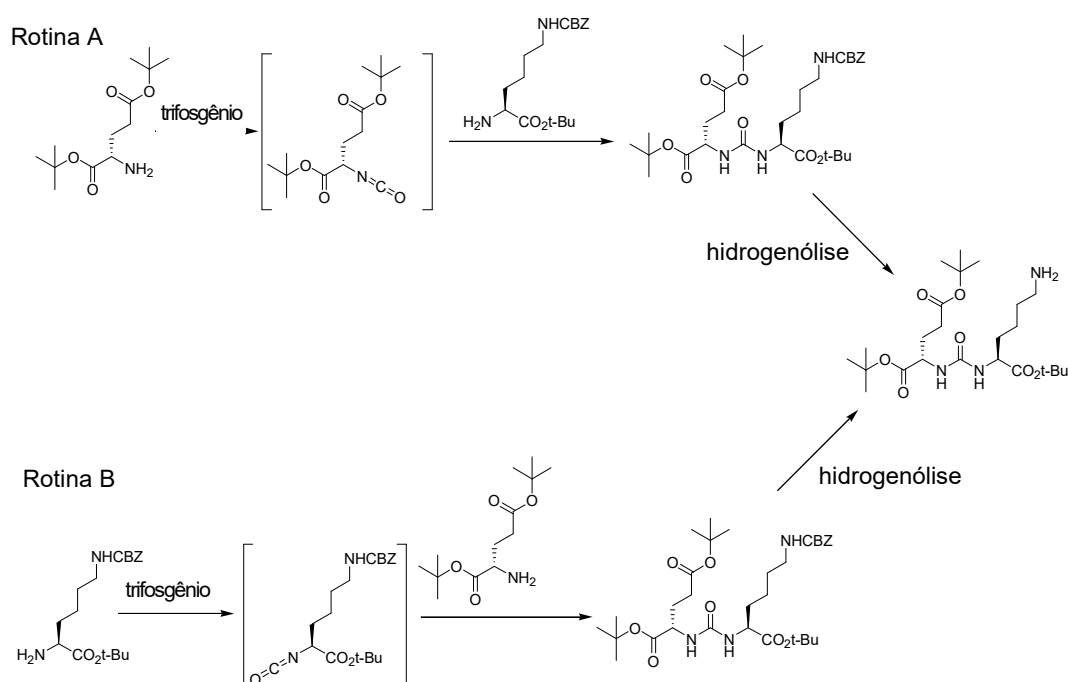
### Éster de di-*tert*-butílico de ácido L-(S)-2-[(imidazol-1-carbonil)-amino]-pentanodióico (2)

[0041] A uma suspensão de cloridrato de glutamato de di-*t*-butila (15,0 g, 51 mmol) em DCM (150 mL) resfriada para 0°C foram

adicionados TEA (18 mL) e DMAP (250 mg). Após agitar durante 5 minutos. CDI (9,0 g, 56 mmol) foi adicionado e a reação foi agitada durante a noite com aquecimento para temperatura ambiente. A reação foi diluída com DCM (150 mL) e lavada com bicarbonato de sódio saturado (60 mL), água (2 X 100 mL) e salmoura (100mL). A camada orgânica foi secada sobre sulfato de sódio e concentradas para fornecer o produto cru como um semi-sólido, que lentamente solidificou-se sob repouso. O material cru foi triturado com hexano/ acetato de etila para fornecer um sólido branco que foi filtrado, lavado com hexano (100 mL) e secado para fornecer o produto desejado (15,9 g, 45 mmol, 88%) como um sólido branco.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,63 (s, 1H), 7,00 (br, 2H), 6,31 (d, 1H), 4,02 (m, 1H), 2,19 (m, 2H), 1,86 (m, 1H), 1,67 (m, 1H), 1,39 (s, 9H), 1,38 (s, 9H). ESMS  $m/z$ : 354 (M+H) $^+$ .



[0042] Alternativamente, os análogos podem ser preparados por meio do isocianato gerado *in situ* usando trifosgênio. Este método pode ser realizado por ativação do resíduo de glutamato e acoplamento com um resíduo de lisina (rotina A) ou por ativação do resíduo de lisina e acoplamento com o glutamato (rotina B) como mostrado no Esquema 2 abaixo.



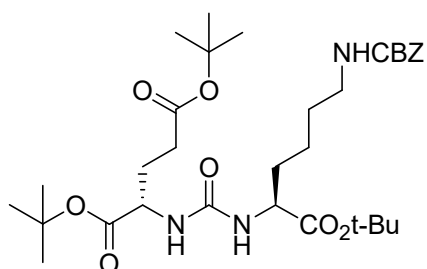
## Esquema 2.

### Éster di-terc-butílico de ácido L-(S,S)-2-[3-(5-benziloxicarbonilamino-1-terc-butoxicarbonil-pentil-ureído)-pentanodióico (3)

[0043] Rotina A. Em um frasco de base redonda 1,8 mL de TEA (13,2 mmol) foram combinados com 1,8 gramas (6 mmol) cloridrato de éster di-terc-butílico de ácido L-glutâmico em 20 mL DCM. Esta solução é adicionada gota a gota durante 45 minutos a uma solução de 10 mL de DCM e trifosgênio (0,7 g, 2,2 mmol) a 0°C. Após agitação de 30 minutos adicionais uma solução de éster H-lis-(Z)-O-t-butílico HCl (2,2 g, 6 mmol) contendo TEA (1,8 mL, 13 mmol) em 15 mL DCM foi adicionado em uma porção. A solução foi agitada durante 1 hora. A reação é concentrada, diluída com 50 mL de acetato de etila, lavada 2N de NaHSO<sub>4</sub> (2x 50 mL), salmoura (50 mL) e secada sobre sódio sulfato para produzir um óleo amarelo. Purificação por cromatografia de coluna para fornecer o produto desejado como um óleo claro que sob repouso solidifica-se em um sólido branco (1,9 g, 54%).

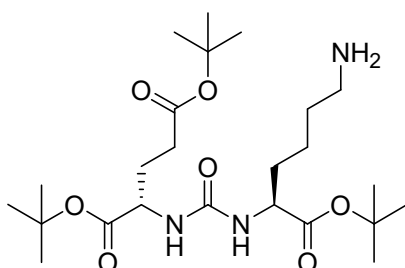
[0044] Rotina B. Em um frasco de base redonda trifosgênio (2,9 g, 10 mmol) é suspenso em DCM (50 mL) e agitado a 0°C. Uma solução de base livre de H-Lisina(Z) (9,1 g, 27 mmol) e DIEA (10,4 mL, 60 mmol)

DCM (50 mL) foi adicionada gota a gota à solução de trifosgênio durante 2,5 horas. Após 2,5 horas uma solução de cloridrato de éster di-terc-butílico de ácido L-glutâmico (8 g, 27 mmol) contendo DIEA (10,4 mL, 60 mmol) DCM (50 mL) foi adicionada em uma porção e deixada agitar durante 45 minutos. A reação foi concentrada até *secura*, diluída com 150 mL de acetato de etila, lavada com 2N de NaHSO<sub>4</sub> (2x 200 mL), salmoura (150 mL) e secada sobre sulfato de sódio para produzir um óleo amarelo. Este óleo foi purificado por cromatografia de coluna (SiO<sub>2</sub>) para fornecer o produto desejado como um óleo claro que sob repouso solidifica-se em um sólido branco (12,0 g, 72%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,34 (m, 5H), 5,33-5,28 (m, 3H), 5,08 (d, *J* = 7,4 Hz, 2H), 4,38-4,29 (m, 2H), 3,15 (m, 2H), 2,32-2,01 (m, 2H), 1,90-1,50 (m, 8H), 1,43-1,40 (m, 27H, *t*-Bu's). ESMS *m/z*: 622 (M+H)<sup>+</sup>.



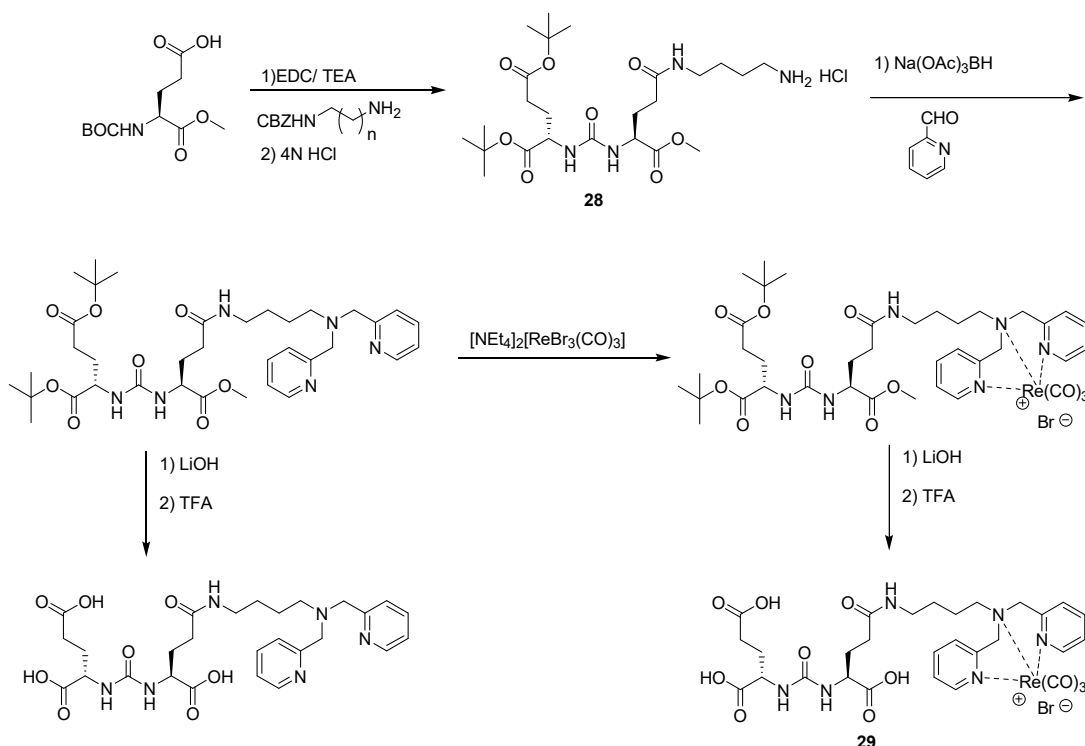
Éster di-terc-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-terc-butoxicarbonil-pentil)-ureído]-pentanodióico (4).

[0045] A uma solução de éster di-terc-butílico de ácido 2-[3-(5-benziloxicarbonilamino-1-terc-butoxicarbonil-pentil)-ureído]-pentanodióico (630 mg, 1,0 mmol) em etanol (20 mL) foi adicionado formiato de amônio (630 mg, 10 equivalentes) seguido por 10% de Pd-C e a suspensão foi deixada repousar com agitação ocasional durante a noite até concluir. A reação foi filtrada através de celita e concentradas para fornecer o produto desejado (479 mg, 98%) como um sólido ceroso. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,15-6,0 (bm, 4H, NH's), 4,29 (m, 2H), 3,02 (m, 2H), 2,33 (m, 2H), 2,06-1,47 (m, 8H), 1,45-1,40 (m, 27H, *t*-Bu's). ESMS *m/z*: 488 (M+H)<sup>+</sup>.



### Síntese dos Compostos de Modelo de Núcleo de Ligação de Glu-Ureia-Glu.

[0046] Nesta série uma ligação é incorporada na cadeia lateral do ácido glutâmico ou lisina antes da conjugação para formar o dímero de ureia. No exemplo abaixo o carboxílico ácido de cadeia lateral de um dos ácidos glutâmico é modificado em uma ligação para anexar um quelante, átomo ou grupo funcional que é ou contém um radionucleotídeo (Esquema 4).

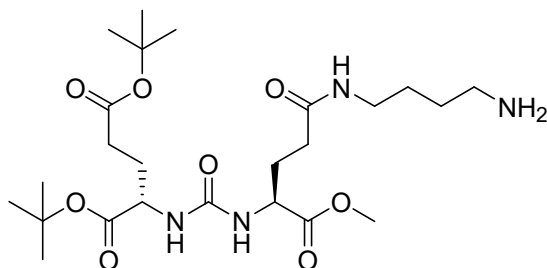


### Esquema 4.

Éster di-terc-butílico de ácido 2-{3-[3-(4-Amino-butilcarbamoil)-1-metoxicarbonil-propil]-ureído}-pentanodióico (28)

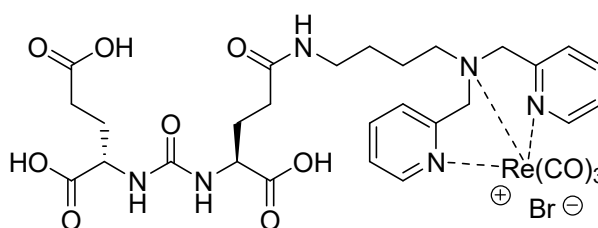
[0047] A uma solução de BOC-Glu(OH)-Oma de éster  $\alpha$ -metílico de ácido glutâmico de *N*-BOC (960 mg, 3,7 mmol) em DMF (6 mL) resfriada

para 0°C foram adicionados EDC (845 mg, 1,3 equivalentes) e TEA (1,3 mL). Após agitar durante 10 minutos, o sal de cloridrato de N-CBZ-1,4-diaminobutano de diamina mono protegida (1 g, 3,8 mmol) foi adicionado e a reação foi deixada agitar durante a noite com aquecimento para temperatura ambiente. A reação crua foi diluída com EA (100 mL) e lavada com e lavada com água (30 mL), ácido cítrico aquoso a 5% (30 mL), bicarbonato de sódio saturado (30 mL), água (30 mL) e salmoura (30 mL). A camada orgânica foi secada sobre sulfato de sódio e concentradas para fornecer o produto cru como um xarope espesso (2,1 g). Ao xarope obtido foram adicionados 4 N de HCl em dioxano (10 mL) e a reação foi agitada a temperatura ambiente durante 3 horas. A concentração forneceu um sólido ceroso (1,8 g) como o sal de cloridrato. O sal foi acoplado ao éster di-terc-butílico de ácido L-(S)-2-[(Imidazol-1-carbonil)-amino]-pentanodióico ativado (2) como descrito nas seções experimentais precedentes para fornecer o dímero totalmente protegido desejado x (1,9 g). Este material foi suspenso em EtOH absoluto (20 mL) excesso de formiato de amônio (5 g) adicionado seguido por Pd(OH)<sub>2</sub> sobre carbono a 20% (100 mg) e a suspensão agitada muito suavemente durante a noite para realizar a clivagem do grupo de proteção de CBZ. A filtração através de celita e a concentração forneceram a amina livre desejada (1,4 g, 2,7 mmol, 73 %, 4 etapas). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,41 (br, 2H), 7,36 9br, 1H), 6,44 (bs, 1H), 6,37 (bs, 1H), 4,37-4,29 (m, 2H), 3,71 (s, 3H), 3,20-1,50 (m, 16H), 1,45 (s, 9H), 1,43 (s, 9H). ESMS *m/z*: 517 (M+H)<sup>+</sup>.



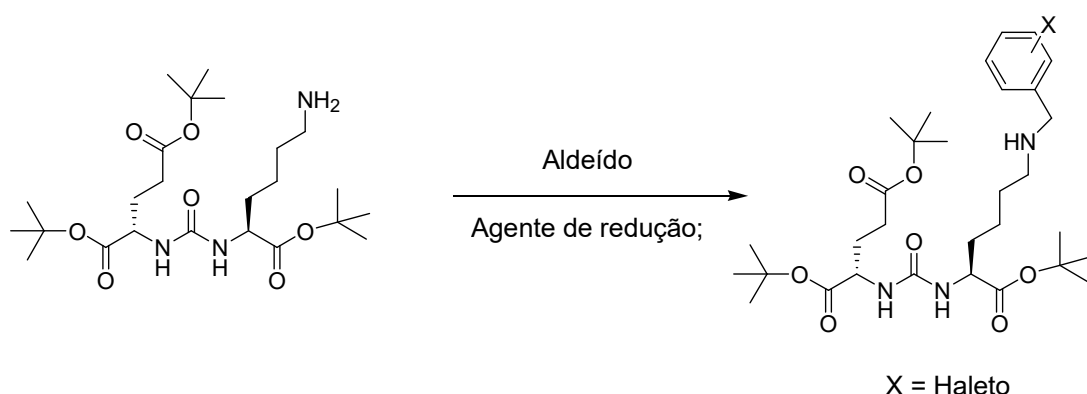
Ácido Re(CO)<sub>3</sub>-2-(3-{3-[4-(Bis-piridin-2-ilmetil-amino)-butilcarbamoil]-1-carbóxi-propil}-ureído)-pentanodióico [Br] (29) (MIP-1100)

[0048] O intermediário protegido foi preparado por aminação redutiva usando diridina-2-carboxaldeído como anteriormente descrito. O tratamento com 2M de LiOH em MeOH realizou a hidrólise do éster metílico. O metanol foi removido e o excesso de DCM:TFA (1:1) foi adicionado e a reação agitada em temperatura ambiente durante a noite. O material cru foi convertido no conjugado de rênio desejado seguindo o procedimento acima descrito. HPLC preparativa forneceu a molécula desejada (9,5 mg, 16%).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,78 (m, 2H), 8,31 (br, 1H), 7,95 (m, 2H), 7,59 (m, 2H), 7,39 (m, 2H), 6,60-6,33 (m, 2H), 4,89 (m, 4H), 4,00 (m, 1H), 3,76 (m, 1H), 3,20-1,2 (m, 16H) (3 CO<sub>2</sub>H não observado) ESMS 842 (M-H)<sup>+</sup>.



### Síntese dos Compostos de Modelo de Núcleo de Glu-ureia-X-benzil-Lisina.

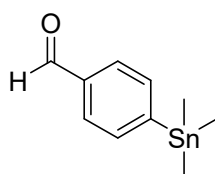
[0049] Os seguintes compostos foram todos preparados em produções totais variando de 20-40% usando a rotina descrita no Esquema 3. A Glu-ureia-lisina Z-desprotegida foi misturada com o aldeído apropriado (0,9 equivalentes) em temperatura ambiente durante uma hora para formar o intermediário de base Dchiff. A base Dchiff foi reduzida usando 1 equivalente de triacetoxiboroidreto de sódio. Os compostos foram desprotegidos usando 50% de TFA em DCM durante 1 hora em temperatura ambiente. Na conclusão, as reações foram concentradas em um evaporador giratório ou foram dilatadas secas com nitrogênio e extraídas usando metileno cloreto e água. A camada de água foi evaporada até secura para fornecer o produto desprotegido em 40 a 80% de produção.



**Esquema 3.** Séries de reação gerais para a síntese de compostos de PSMA halogenados.

#### 4-Trimetilstananil-benzaldeído (5).

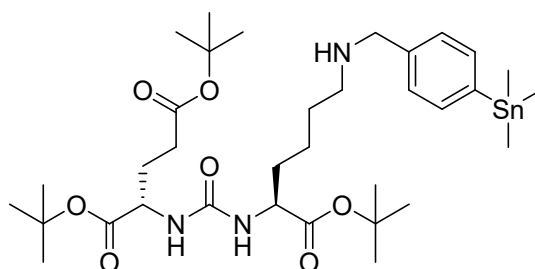
[0050] A uma solução de 4-iodobenzaldeído (1,92 g, 8,27 mmol) em dioxano seco (60 mL) foi adicionado hexametilditina (4,1 mL, 19,8 mmol) seguido por Pd(Ph<sub>3</sub>P)Cl<sub>2</sub> (150 mg) e a mistura reacional foi aquecida durante 3 horas sob refluxo até julgada completa. A reação foi filtrada através de celita e purificada por cromatografia de coluna usando hexanos/acetato de etila (9/1) como eluente para fornecer (2,24 g, 98%) como um óleo claro. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,97 (s, 1H), 7,81 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 7,72 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 0,29 (s, 9H). ESMS *m/z*: 268 (feixe-Sn).



#### Éster di-terc-butílico de ácido 2-[3-[1-terc-butoxicarbonil-5-(4-trimetilstananil-benzilamino)-pentil]-ureído]-pentanodióico (6).

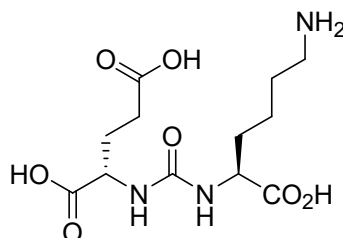
[0051] A uma solução de éster di-terc-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-terc-butoxicarbonil-pentil)-ureído]-pentanodióico (150 mg, 0,31 mmol) em DCE (10 mL) foi adicionado 4-trimetilstananil-benzaldeído (82 mg, 0,31 mmol) seguido por triacetoxiboroidreto de sódio (98 mg, 0,47 mmol) e a reação foi agitada durante a noite a 40°C. A reação foi concentrada e purificada por cromatografia de coluna usando hexanos/acetato de etila como eluente para fornecer o produto desejado

(88 mg, 38%) como um xarope espesso que começa a solidificar-se sob repouso.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  7,48 (d,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 7,30 (d,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 6,27 (m, 2H, NH's), 3,96 (m, 4H), 2,74 (bm, 2H), 2,21 (m, 2H), 1,87 (m, 2H), 1,65-1,19 (m, 7H), 1,35 (m, 27H, *t*-Bu's), 0,23 (s, 9H). ESMS  $m/z$ : 742 (feixe-Sn).



Ácido (S, S)-2-[3-(5-amino-1-carbóxi-pentil)-ureído]-pentanodióico (7)  
(MIP 1033)

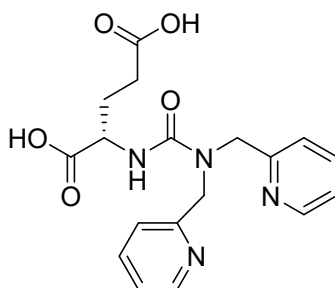
[0052] O mesmo procedimento experimental como descrito no Esquema 1, produziu 8% de éster di-*tert*-butílico de ácido 2-[3-(5-benziloxicarbonilamino-1-*tert*-butoxicarbonil-pentil)-ureído]-pentanodióico. O composto foi desprotegido usando os métodos anteriormente descritos e purificado por HPLC para fornecer o produto desejado.  $^1\text{H}$  RMN (éster tri-*t*-butílico de amina Z-protégida) (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12,2 (s, 3H), 6,4 (s, 2H), 4,15 (m, 2H), 3,45 (m, 1H), 2,75 (bs, 1H), 2,2 (m, 4H), 1,90 (m, 2H), 1,65 (m, 2H), 1,50 (s, 2H), 1,35 (m, 2H). ESMS  $m/z$ : 622 (M-H)<sup>+</sup>.



Ácido (S)-2-(3,3-bis-piridin-2-ilmetil-ureído)-pentanodióico (8) (MIP 1025).

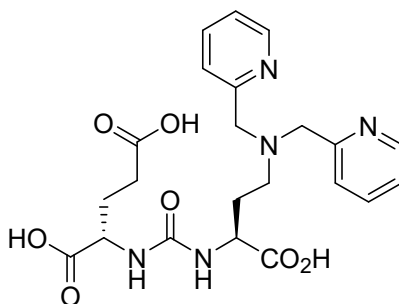
[0053] O mesmo procedimento experimental como na síntese geral, produziu 0,65 g, 48% de éster di-*tert*-butílico de ácido 2-(3,3-Bis-piridin-2-ilmetil-ureído)-pentanodióico. O composto foi desprotegido usando os

métodos anteriormente descritos e purificado por HPLC para fornecer o produto desejado.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12,0 (bs, 2H), 8,68 (d, 2H), 8,00 (m, 2H), 7,41 (d, 4H), 7,14 (d, 1H), 4,73 (d, 4H), 3,96 (s, 1H), 2,18 (m, 2H), 1,80 (m, 2H).



Ácido (S, S)-2-{3-[3-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-1-carbóxi-propil]-ureído}-pentanodióico (9) (MIP 1028).

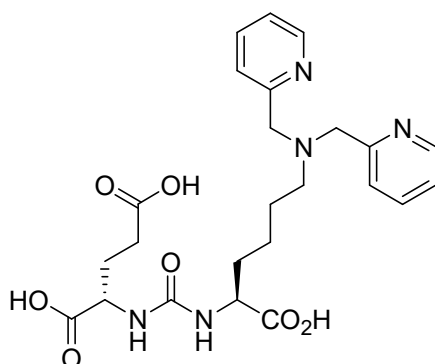
[0054] O mesmo procedimento experimental como na síntese geral no Esquema 1, produziu 0,16 g, 35% de éster di-terc-butílico de ácido 2-{3-[3-(Bis-piridin-2-ilmetil-amino)-1-carbóxi-propil]-ureído}-pentanodióico. O composto foi desprotegido usando os métodos anteriormente descritos e purificado por HPLC para fornecer o produto desejado.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12,4 (br, 2H), 9,37 (s, 1H), 8,52 (d, 2H), 7,80 (t, 2H), 7,14 (dd, 4H), 6,45 (m, 2H), 4,49 (br, 4H), 4,12 (s, 1H), 4,05 (s, 1H), 3,21 (m, 2H), 2,24 (m, 2H), 1,80 (m, 2H), 1,40 (m, 2H). ESMS  $m/z$ : (éter dietílico)429 (M)<sup>+</sup>, 451 (M+Na).



Ácido (S, S)-2-{3-[5-(bis-piridin-2-ilmetil-amino)-1-carbóxi-pentil]-ureído}-pentanodióico (10) (MIP 1008).

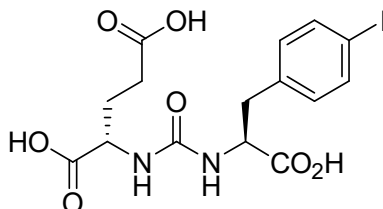
[0055] O mesmo procedimento experimental como na síntese geral, produziu 0,09 g, 12% de éster di-terc-butílico de ácido 2-{3-[5-(Bis-piridin-2-ilmetil-amino)-1-carbóxi-pentil]-ureído}-pentanodióico. O

composto foi desprotegido usando os métodos anteriormente descritos e purificado por HPLC para fornecer o produto desejado.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12,7 (s, 2H), 8,97 (s, 1H), 8,65 (dd, 2H), 7,91 (dd, 2H), 7,45 (m, 4H), 6,44 (d, 1H), 6,28 (d, 1H), 4,45 (br, 4H), 4,10 (m, 2H), 3,15 (br, 2H), 2,60 (m, 2H), 2,25 (m, 2H), 1,90 (m, 2H), 1,78 (m, 2H), 1,45 (m, 2H).



Ácido (S)-2-{3-[1-carboxy-2-(4-iodo-phenil)-etil]-ureído}-pentanodióico (11) (MIP-1034).

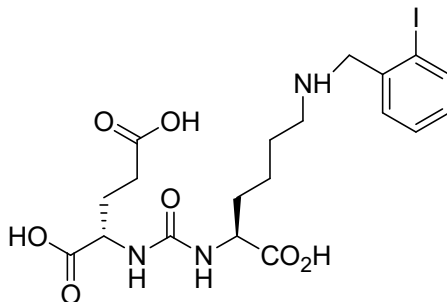
[0056] O mesmo procedimento experimental como na síntese geral, produziu 0,038 g, 5% de éster di-terc-butílico de ácido 2-{3-[1-carboxy-2-(4-iodo-phenil)-etil]-ureído}-pentanodióico. O composto foi desprotegido usando os métodos anteriormente descritos.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12,40 (s, 3H), 7,65 (dd, 2H), 7,05 (dd, 2H), 6,30 (m, 2H), 4,25 (s, 1H), 4,05 (s, 1H), 2,90 (m, 2H), 2,2 (m, 2H), 1,80 (m, 2H). ESMS  $m/z$ : 429 ( $\text{M}^+$ ), 451 ( $\text{M}+\text{Na}$ ).



Ácido (S, S)-2-{3-[1-carboxy-5-(2-iodo-benzilamino)-pentil]-ureído}-pentanodióico (12) (MIP 1035).

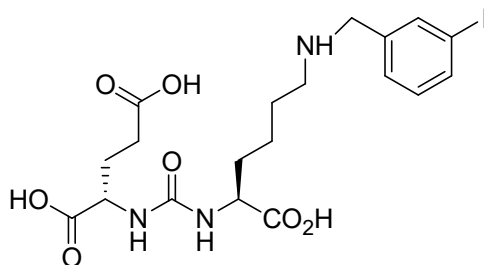
[0057] O mesmo procedimento geral, usando o éster di-t-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxy-pentil)-ureído]-pentanodióico previamente preparado e protegido. O composto foi desprotegido

usando os métodos anteriormente descritos (5,5 mg, 66%).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12,4 (s, 3H), 8,8 (s, 1H), 7,94 (m, 1H), 7,5 (m, 1H), 7,16 (t, 1H), 6,38 (m, 2H), 4,15 (m, 5H), 3,06 (s, 2H), 2,85 (s, 1H), 2,2 (m, 2H), 1,90 (m, 1H), 1,70 (m, 2H), 1,50 (s, 2H), 1,35 (m, 2H). ESMS  $m/z$ : 536 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .



Ácido (S, S)-2-{3-[1-carbóxi-5-(3-iodo-benzilamino)-pentil]-ureído}-pentanodióico (13) (MIP 1089).

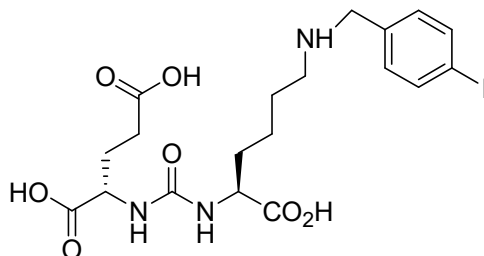
[0058] O mesmo procedimento geral, usando previamente preparado e protegido éster di-*t*-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-carbóxi-pentil)-ureído]-pentanodióico. O composto foi desprotegido usando os métodos anteriormente descritos (4,1 mg, 53%).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12,4 (s, 3H), 8,7 (s, 2H), 7,9 (s, 1H), 7,8 (d, 1H), 7,44 (d, 1H), 7,22 (t, 1H), 6,25 (s, 2H), 4,09 (m, 5H), 2,89 (s, 1H), 2,75 (s, 1H), 2,2 (d, 2H), 1,90 (m, 2H), 1,65 (m, 2H), 1,40 (m, 2H).



Ácido (S, S)-2-{3-[1-carbóxi-5-(4-iodo-benzilamino)-pentil]-ureído}-pentanodióico (14) (MIP 1072).

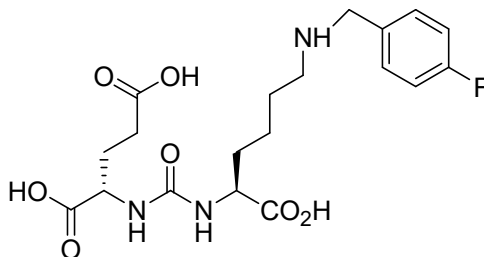
[0059] O mesmo procedimento geral, usando éster di-*t*-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-carbóxi-pentil)-ureído]-pentanodióico previamente preparado e protegido. O composto foi desprotegido usando os métodos anteriormente descritos (12 mg, 66%).  $^1\text{H}$  RMN (400

MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12,4 (bs, 3H) 8,8 (br, 1H), 7,8 (d, 2H), 7,27 (d, 2H), 6,35 (br, 2H), 4,1 (m, 4H), 2,89 (m, 2H), 2,2 (d, 2H), 1,90 (m, 2H), 1,65 (m, 4H), 1,35 (m, 2H). ESMS  $m/z$ : 536 (M+H)<sup>+</sup>.



(S,S)-2-{3-[1-carboxy-5-(4-iodobenzylamino)-pentil]-ureído}-pentanodióico (15) (MIP 1090).

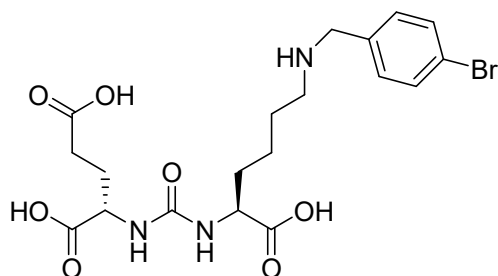
[0060] O mesmo procedimento geral, usando éster di-*t*-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureído]-pentanodióico previamente preparado e protegido. O composto foi desprotegido usando os métodos anteriormente descritos. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12,4 (br, 3H), 8,7 (br, 1H), 7,5 (m, 2H), 7,3 (m, 2H), 6,35 (m, 2H), 4,1 (m, 4H), 2,9 (m, 2H), 2,2 (d, 2H), 1,90 (m, 2H), 1,60 (m, 4H), 1,35 (m, 2H). ESMS  $m/z$ : 428 (M+H)<sup>+</sup>, 450 (M+ Na).



(S,S)-2-{3-[1-carboxy-5-(4-bromobenzylamino)-pentil]-ureído}-pentanodióico (16) (MIP 1094).

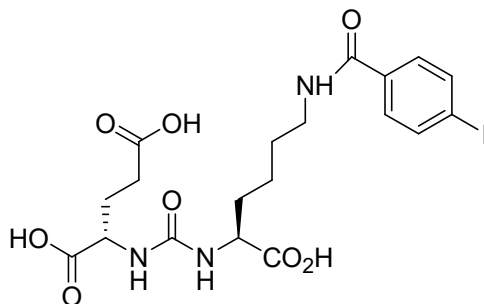
[0061] O mesmo procedimento geral, usando éster di-*t*-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureído]-pentanodióico previamente preparado e protegido. <sup>1</sup>HRMN (éster tri-*t*-butílico) (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7,52 (d, 2H), 7,32 (d, 2H), 6,28 (m, 2H), 3,98 (m, 2H), 2,55 (t, 2H), 2,48 (t, 2H), 2,22 (m, 2H), 1,85 (m, 2H), 1,62 (m, 2H), 1,45 (m, 2H), 1,37 (s, 27H), 1,28 (m, 2H) ESMS  $m/z$ : 642 (M+H)<sup>+</sup>. O composto foi desprotegido usando os métodos anteriormente descritos. ESMS

$m/z$ : 474 (M+H)<sup>+</sup>.



(S,S)-2-{3-[1-carboxy-5-(4-bromobenzoilamino)-pentil]-ureído}-pentanodióico ácido (17) (MIP 1044).

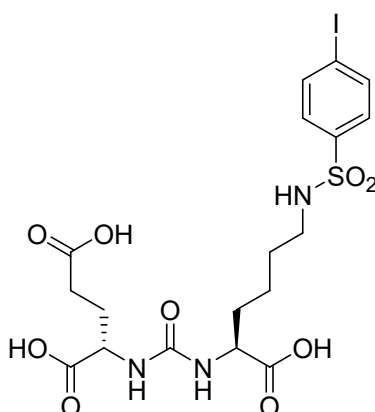
[0062] O mesmo procedimento geral, usando éster di-*t*-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureído]-pentanodióico previamente preparado e protegido. O composto foi desprotegido usando os métodos anteriormente descritos. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12,4 (s, 3H), 8,45 (s, 1H), 7,8 (dd, 2H), 7,6 (dd, 2H), 6,3 (s, 2H), 5,75 (s, 1H), 4,1 (m, 4H), 3,2 (s, 2H), 2,25 (d, 2H), 1,90 (m, 1H), 1,65 (m, 2H), 1,4 (m, 2H).



Ácido 2-{3-[1-carboxy-5-(4-iodobenzenosulfonilamino)-pentil]-ureído}-pentanodióico (18). (MIP 1097).

[0063] Em um frasco de base redonda éster di-*t*-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureído]-pentanodióico (300 mg, 0,62 mmol) é suspenso em água (10 mL) e 1,4 dioxano (10 mL) e TEA (1,75 mL, 1,25 mmol) foram adicionados seguido por cloreto de 4-iodo-benzonossulfonila e a mistura agitada durante a noite at 50°C. A mistura reacional foi evaporada até *secura*, absorvida em DCM e cromatografada sobre sílica gel para fornecer o produto desejado (375 mg, 80%) como um óleo claro. O composto foi desprotegido usando os

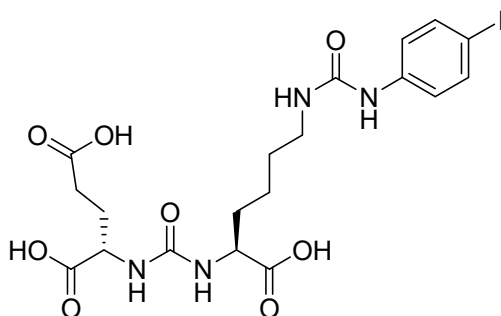
métodos anteriormente descritos seguido por purificação por HPLC para fornecer o produto desejado MIP-1097 como um sólido branco (270 gramas, 90% de produção).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  7,97 ((d, 2H), 7,68 (t, 1H), 7,53(d, 2H), 6,35 (dd, 2H), 4,10 (m, 1H), 4,00 (m, 1H), 2,65 (m, 2H), 2,22 (m, 2H), 1,9 (m, 1H), 1,7 (m, 1H), 1,55 (m, 1H), 1,45 (m, 1H), 1,35 (m, 2H), 1,25 (m, 2H), (3  $\text{CO}_2\text{H}$  não observado). ESMS  $m/z$ : 565 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .



Ácido 2-(3-{1-carboxy-5-[3-(4-iodophenyl)ureido]-pentil}-ureido)-pentanodióico (19) (MIP 1095)

[0064] Em um frasco de base redonda isocianato de 4-iodo-fenila (100 mg, 0,41 mmol) é dissolvido em DCM (10 mL) contendo TEA (0,057 mL, 0,4 mmol). Éster di-t-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureído]-pentanodióico (200 mg, 0,41 mmol) foi adicionado e agitado durante 3 horas. A mistura reacional foi evaporada até secura e a mistura crua absorvida em metanol (5 mL). A adição gota a gota à água (20 mL) forneceu um precipitado branco que foi coletado e lavado com água (20 mL) e secado para fornecer o éster tri-terc-butílico desejado como um sólido branco que foi desprotegido diretamente usando o método previamente descrito para fornecer o produto desejado (158 mg, 53%) como um sólido branco.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,51 ((s, 1H), 7,5 (d, 2H), 7,22 (d, 2H), 6,3 (t, 2H), 6,16 (t, 1H), 4,05 (m, 2H), 3,05 (m, 2H), 2,24 (m, 2H), 1,9 (m, 1H), 1,68 (m, 2H), 1,52 (m, 1H), 1,38 (m, 2H), 1,28 (m, 2H), (3  $\text{CO}_2\text{H}$  não observado).

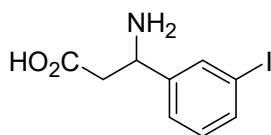
ESMS  $m/z$ : 565 (M+H)<sup>+</sup>.



### Síntese de Glu-Ureia-β-Fenil Glicinas

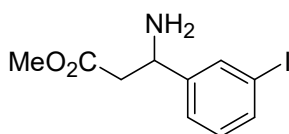
#### Ácido (±)3-amino-3-(3-iodo-fenil)-propiónico (20).

[0065] Ácido malônico (2,2 g, 21,5 mmol) e 3-iodobenzaldeído (5 g, 21,5 mmol) foram suspensos em etanol (50 mL) e acetato de amônio (1,66 g, 21,5 mmol) foi adicionado e a reação aquecida até refluxo durante a noite. A reação foi resfriados para a temperatura ambiente filtrada e lavada com etanol seguido por éter e secado para fornecer o produto (3,4 g, 11,6 mmol, 54%) como um sólido branco. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,80 (s, 1H), 7,64 (dd, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,42 (dd, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,16 (dd, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,14 (dd, *J* = 7,6 Hz, 1H), 4,21 (m, 1H), 2,36 (m, 2H).



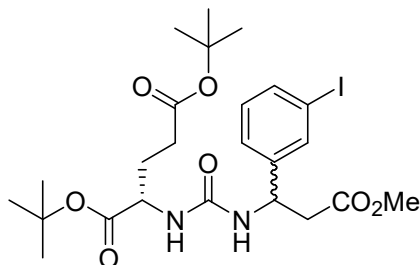
#### Éster metílico de ácido (±)-3-amino-3-(3-iodo-fenil)-propiónico (21).

[0066] A uma suspensão de (±)3-amino-3-(3-iodo-fenil)-propiónico ácido (3,1 g, 10,6 mmol) em metanol foi adicionado cloreto de tionila (0,95 mL, 12,7 mmol) e a reação foi agitada a temperatura ambiente durante a noite. A concentração seguida por trituração com éter fornece um sólido branco. O sólido é filtrado, lavado com éter e secado para fornecer o produto desejado (3,5 g, 10 mmol, 95%) como um sólido branco. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,79 (br, 2H), 8,01 (s, 1H), 7,74 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H). 7,57 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,21 (dd, *J* = 8,1, 7,8 Hz, 1H), 4,56 (br, 1H), 3,54 (s, 3H), 3,23-3,17 (m, 1H), 3,04-2,98 (m, 1H).



Éster di-terc-butílico de ácido (S, R) e (S, S)-2-{3-[1-(3-iodo-fenil)-2-metoxicarbonil-etil]-ureído}-pentanodióico (22).

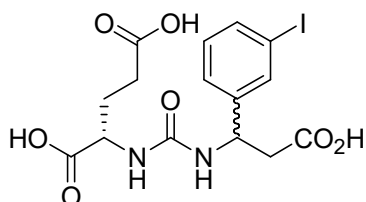
[0067] Éster di-terc-butílico de ácido 2-[(imidazol-1-carbonil)-amino]-pentanodióico (370 mg, 1,05 mmol) foi dissolvido em DCE (10 mL) e resfriado para 0°C. MeoTf (142 µL, 1,25 mmol) foi adicionado e a reação foi deixada prosseguir durante 20 minutos. Éster metílico de ácido (±) 3-amino-3-(3-iodo-fenil)-propiônico (356 mg, 1,045 mmol) foi adicionado e a reação foi deixada aquecer para temperatura ambiente e em seguida aquecida para 55°C e agitada durante a noite. A reação foi diluída com DCM (50 mL) e lavada com água (30 mL), ácido cítrico aquoso a 5% (30 mL), bicarbonato de sódio saturado (30 mL), água (30 mL) e salmoura (30 mL). A camada orgânica foi secada sobre sulfato de sódio e concentradas para fornecer o produto cru. O produto foi purificado por cromatografia de coluna para fornecer o produto desejado (303 mg, 0,51 mmol, 49%) como uma espuma branca. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,66 (s, 1H), 7,57 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,07-7,02 (m, 1H), 5,74 (br, 1H), 5,17 (br, 2H), 4,30 (m, 1H), 3,63 (s, 1,5H), 3,62 (s 1,5H), 2,88-2,76 (m, 2H), 2,38-2,24 (m, 2H), 2,10-2,00 (m, 1H), 1,90-1,80 (m, 1H), 1,46 (s, 9H), 1,44 (s, 9H).



Ácido (S, R) e (S, S)-2-{3-[2-carbóxi-1-(3-iodo-fenil)-etil]-ureído}-pentanodióico (23).

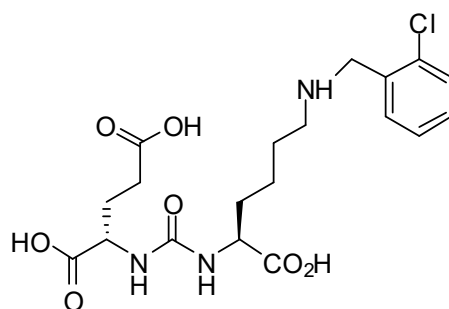
[0068] A uma solução de éster di-terc-butílico de ácido (±)2-{3-[1-(3-iodo-fenil)-2-metoxicarbonil-etil]-ureído}-pentanodióico (289 mg, 0,49

mmol) foi dissolvido em metanol (3 mL) e 2M LiOH (0,5 mL) foi adicionado e a reação agitada em temperatura ambiente durante a noite. A reação foi diluída com água (20 mL) e a camada orgânica foi extraída com acetato de etila (2 X 20 mL) em seguida acidificada com 1N de HCl para o pH ~ 2. A camada aquosa foi extraída com acetato de etila (3 X 20 mL), secada sobre sulfato de sódio e concentrada para fornecer o produto cru (206 mg, 0,36 mmol, 73%) como um sólido branco. Ao material cru foi adicionado DCM (2 mL) seguido por TFA (2 mL) e a reação foi agitada a temperatura ambiente durante a noite. A concentração seguida por recristalização de acetato de etila forneceu o produto desejado (22 mg, 0,047 mmol, 10%) como um sólido branco.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12,39 (br, 3H), 7,64 (br, 1H), 7,56 (m, 1H), 7,30 (bm, 1H), 7,10 (bm, 1H), 6,72 (bm, 1H), 6,34 (bm, 1H), 4,94 (br, 1H), 4,03 (bm, 1H), 2,64 (br, 2H), 2,20 (br, 2H), 1,86 (br, 1H), 1,71 (br, 1H). ESMS  $m/z$ : 463 (M-H) $^+$ .



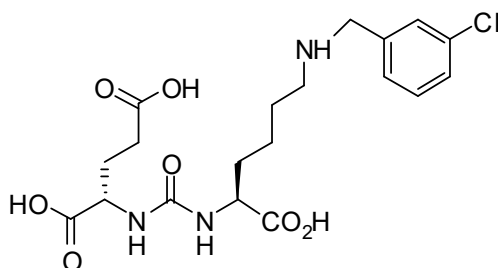
(S,S)-2-{3-[1-carboxy-5-(2-cloro-benzilamino)-pentil]-ureído}-pentanodióico (7) (MIP-1137).

[0069] O mesmo procedimento geral como mostrado no Esquema 1, usando éster di-t-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureído]-pentanodióico previamente preparado e protegido. O composto foi desprotegido usando os métodos anteriormente descritos para produzir o produto desejado (100 mg, 45%) como um sólido não totalmente branco.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,0 (br, 3H), 7,63 (d, 1H), 7,2 (m, 2H), 7,15 (d, 1H), 6,30 (d, 2H), 4,1 (m, 4H), 2,9 (br, 2H), 2,2 (m, 2H), 1,90 (m, 2H), 1,60 (m, 4H), 1,35 (m, 2H). ESMS  $m/z$ : 444 (M+H) $^+$ .



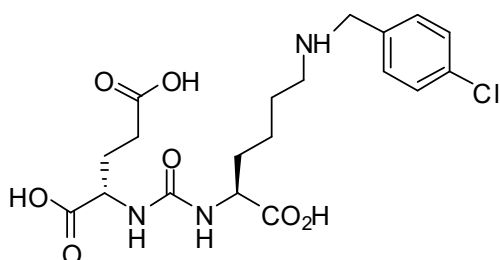
(S,S)-2-{3-[1-carboxy-5-(3-cloro-benzilamino)-pentil]-ureído}-pentanodióico (8) (MIP 1131).

[0070] O mesmo procedimento geral como mostrado no Esquema 1, usando éster di-t-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureído]-pentanodióico previamente preparado e protegido. O composto foi desprotegido usando os métodos anteriormente descritos para produzir o produto desejado (200 mg, 90%) como um sólido não totalmente branco.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,9 (br, 3H), 7,6 (s, H), 7,43 (m, 3H), 6,39 (br, 2H), 4,1 (m, 4H), 2,9 (br, 2H), 2,2 (m, 2H), 1,90 (m, 2H), 1,60 (m, 4H), 1,35 (m, 2H). ESMS  $m/z$ : 444 (M+H) $^+$ .



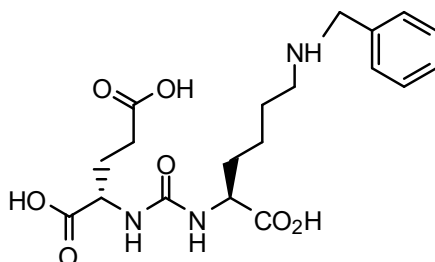
(S,S)-2-{3-[1-carboxy-5-(4-cloro-benzilamino)-pentil]-ureído}-pentanodióico (9) (MIP 1135).

[0071] O mesmo procedimento geral como mostrado no Esquema 1, usando éster di-t-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxi-pentil)-ureído]-pentanodióico previamente preparado e protegido. O composto foi desprotegido usando os métodos anteriormente descritos para produzir o produto desejado (10 mg, 66%) como um sólido não totalmente branco. ESMS  $m/z$ : 444 (M+H) $^+$ .



Ácido (S)-2-(3-((R)-5-(benzilamino)-1-carboxipentil)ureído)pentanodióico (10). (MIP-1106).

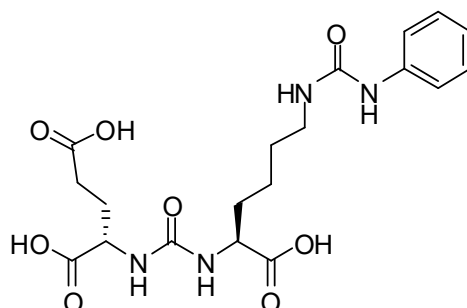
[0072] O mesmo procedimento geral como mostrado no Esquema 1, usando éster di-t-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-carbóxi-pentil)-ureído]-pentanodióico previamente preparado e protegido. O composto foi desprotegido usando os métodos anteriormente descritos para produzir o produto desejado (5 mg, 47%) como um sólido não totalmente branco. ESMS  $m/z$ : 410 (M+H)<sup>+</sup>.



Ácido 2-(3-{1-carbóxi-5-[3-(fenil)-ureído]-pentil}-ureído)-pentanodióico (11) (MIP 1111).

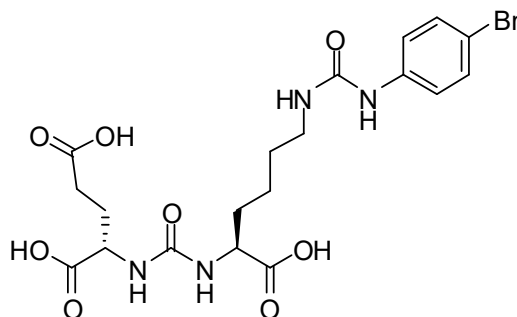
[0073] Em um frasco de base redonda isocianato de fenila (100 mg, 0,84 mmol) foi dissolvido em DCM (10 mL). Éster di-t-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-carbóxi-pentil)-ureído]-pentanodióico (409 mg, 0,84 mmol) foi adicionado e agitado durante 3 horas. A mistura reacional foi evaporada até *secura* e a mistura crua foi purificada por meio de cromatografia de coluna *flash* 2:1 hexanos/acetato de etila para fornecer o éster terc-butílico como um sólido branco que foi desprotegido usando TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fornecendo o produto desejado. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12,5 (s, 3H), 8,54 (s, 1H), 7,40 (dd, 2H), 7,26 (dd, 2H), 6,30 (t, 2H), 6,17 (t, 1H), 4,05 (m, 2H), 3,05 (m, 2H), 2,44 (m, 2H), 1,90 (m, 1H), 1,68 (m, 2H) 1,52 (m, 1H). 1,40 (m, 2H). 1,29 (m, 2H). ESMS  $m/z$ : 439

(M+H)<sup>+</sup>.



Ácido 2-(3-{1-carboxy-5-[3-(4-bromo-phenyl)-ureido]-pentil}-ureido)-pentanodióico (12) (MIP 1129)

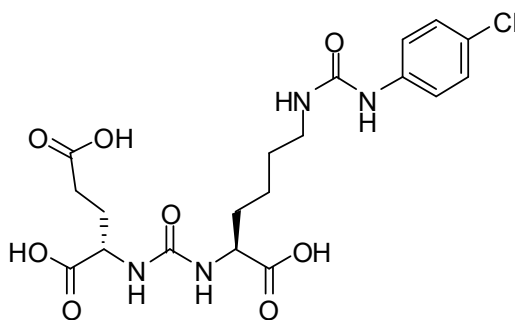
[0074] Em um frasco de base redonda isocianato de 4-bromo-fenila (100 mg, 0,50 mmol) foi dissolvido em DCM (10 mL). Éster di-*t*-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxy-pentil)-ureido]-pentanodióico (246 mg, 0,50 mmol) foi adicionado e agitado durante 3 horas. A mistura reacional foi evaporada até *secura* e a mistura crua foi purificada por meio de cromatografia de coluna flash 2:1 hexanos/acetato de etila para fornecer o éster *terc*-butílico como um sólido branco que foi desprotegido usando TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fornecendo o produto desejado <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12,5 (s, 3H), 8,55 (s, 1H), 7,35 (d, 4H), 6,30 (t, 2H), 6,18 (t, 1H), 4,08 (m, 2H), 3,05 (m, 2H), 2,22 (m, 2H), 1,90 (m, 1H), 1,68 (m, 2H), 1,52 (m, 1H), 1,40 (m, 2H), 1,30 (m, 2H). ESMS *m/z*: 518 (M+H)<sup>+</sup>.



Ácido 2-(3-{1-carboxy-5-[3-(4-cloro-phenil)-ureido]-pentil}-ureido)-pentanodióico (13) (MIP 1110)

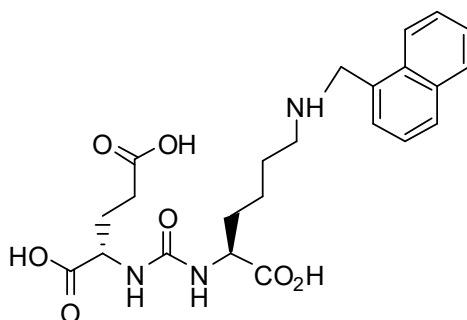
[0075] Em um frasco de base redonda isocianato de 4-cloro-fenila (100 mg, 0,65 mmol) foi dissolvido em DCM (10 mL). Éster di-*t*-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-carboxy-pentil)-ureido]-pentanodióico (318 mg,

0,65 mmol) foi adicionado e agitado durante 3 horas. A mistura reacional foi evaporada até secar e a mistura crua foi purificada por meio de cromatografia de coluna *flash* 2:1 hexanos/acetato de etila para fornecer o éster terc-butílico como um sólido branco (470 mg, 96%) que foi desprotegido usando TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fornecendo o produto desejado <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12,5 (s, 3H), 8,35 (s, 1H), 7,40 (dd, 2H), 7,19 (dd, 2H), 6,30 (t, 2H), 6,10 (t, 1H), 4,08 (m, 2H), 3,05 (m, 2H), 2,32 (m, 2H), 1,90 (m, 1H), 1,68 (m, 2H), 1,52 (m, 1H), 1,40 (m, 2H), 1,30 (m, 2H). ESMS *m/z*: 474 (M+H)<sup>+</sup>.



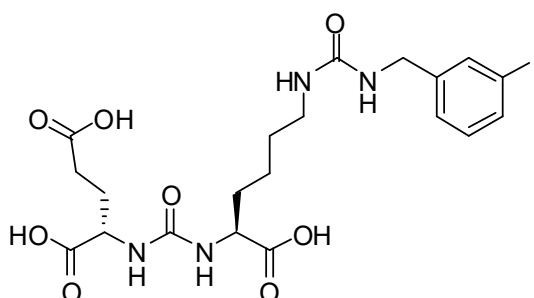
Ácido (S)-2-(3-((R)-1-carbóxi-5-(diridinano-1-ilmetilamino)pentil)ureído) pentanodióico. (14) (MIP-1108).

[0076] O mesmo procedimento geral como mostrado no Esquema **A**, usando éster di-*t*-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-carbóxi-pentil)ureído]-pentanodióico previamente preparado e protegido. O composto foi desprotegido usando os métodos anteriormente descritos para produzir o produto desejado (51 mg, 70%) como um sólido não totalmente branco. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,9 (br, 3H), 7,95 (m, 5H), 7,6 (m, 2H), 6,35 (br, 2H), 4,1 (m, 4H), 2,9 (br, 2H), 2,55 (m, 2H), 2,25 (m, 2H), 1,70 (m, 4H), 1,3 (m, 2H). ESMS *m/z*: 460 (M+H)<sup>+</sup>.



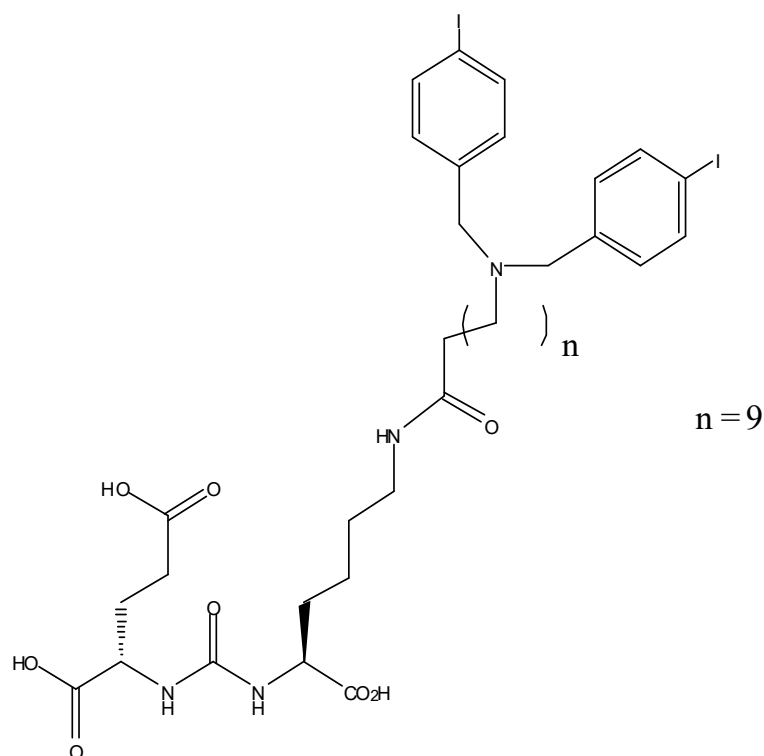
Ácido 2-(3-{1-carbóxi-5-[3-(3-iodo-benzil)-ureído]-pentil}-ureído)-pentanodióico (15) (MIP-1101).

[0077] O mesmo procedimento geral como mostrado no Esquema 2, usando éster di-*t*-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-carbóxi-pentil)-ureído]-pentanodióico previamente preparado e protegido. O composto foi desprotegido usando os métodos anteriormente descritos para produzir o produto desejado. ESMS  $m/z$ : 579 (M+H)<sup>+</sup>.



Ácido (19S,23S)-2-(4-iodobenzil)-1-(4-iodofenil)-13,21-dioxo-2,14,20,22-tetraazapentacosano-19,23,25-tricarboxílico (16) (MIP-1130).

[0078] O mesmo procedimento geral como mostrado no Esquema A, usando éster di-*t*-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-carbóxi-pentil)-ureído]-pentanodióico previamente preparado e protegido. O composto foi desprotegido usando os métodos anteriormente descritos para produzir o produto desejado (8,3 mg, 10%) como um sólido não totalmente branco. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,8 (d), 7,3 (d), 6,3 (dd), 4,25 (br), 4,05 (m), 2,97 (m), 2,85 (br), 2,22 (m), 2,05 (m), ,90 (m), 1,64 (m), 1,48 (m), 1,35 (m), 1,2 (m). ESMS  $m/z$ : 936 (M+H)<sup>+</sup>.

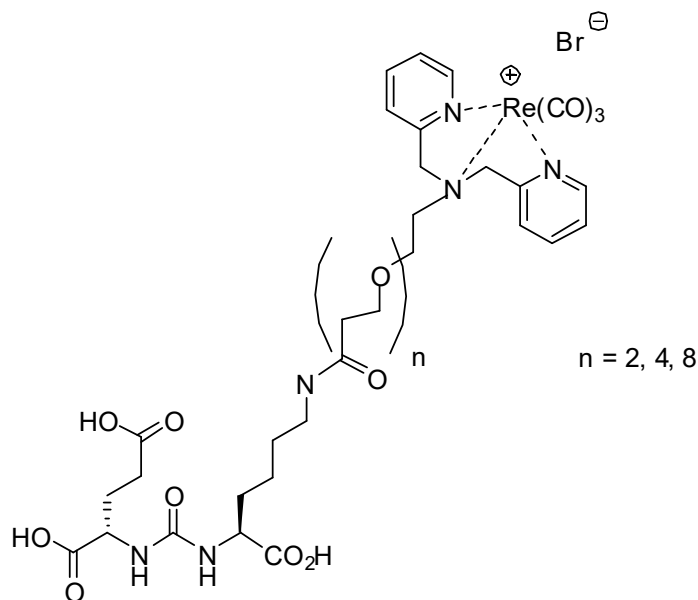


### Experiência Geral de Rênio:

[0079] Os complexos de rênio dos inibidores de SAAC são convenientemente isolados das reações do precursor facilmente disponível  $[\text{Net}_4]_2[\text{Re}(\text{CO})_3\text{Br}_3]$  com o inibidor de SAAC. Visto que os grupos doadores fornecidos pelo terminal SAAC são bem documentados como quelantes eficazes para o núcleo de  $\{\text{M}(\text{CO})_3\}^{+1}$  e foram designados adotarem uma disposição facial requerida em torno do sítio de metal, as preparações dos complexos foram irrepreensíveis.

[0080] O sistema de  $\{\text{Re}(\text{I})(\text{CO})_3\}^+$  seguiu a química de reação similar àquela do Núcleo de tricarbonila de Tc-99m. O uso de  $[\text{Net}_4]_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$ , como o material de partida induz à fácil formação do núcleo de fac- $\{\text{Re}(\text{CO})_3(\text{L})_3\}$ . O  $[\text{Net}_4]_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$  foi facilmente derivado do  $[\text{ReBr}(\text{CO})_5]$ . A síntese dos complexos de Re(I) foi realizada reagindo  $[\text{Net}_4]_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$  com o ligante de TEC apropriado na relação de 1: 1,2 em 10 ml de metanol. A reação foi deixada aquecer a  $80^\circ\text{C}$  durante 4 horas. Após resfriar todos os seguintes produtos de

reação foram todos purificados usando uma pequena coluna de sílica com produções variando de 10-30%.



Glu-ureia-Lis-PEG2-ReDP:

[Re(CO)<sub>3</sub>{ácido (17R,21S)-11,19-dioxo-1-(diridina-2-il)-2-(diridina-2-ilmetil)-5,8-dioxa-2,12,18,20-tetraazatricosano-17,21,23-tricarboxílico}]  
[Br]. (17) (MIP-1133).

[0081] O composto de dipiridila de PEG2, ácido (17R,21S)-11,19-dioxo-1-(diridina-2-il)-2-(diridina-2-ilmetil)-5,8-dioxa-2,12,18,20-tetraazatricosano-17,21,23-tricarboxílico foi preparado empregando o mesmo procedimento geral como mostrado no Esquema 1, usando éster di-*t*-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-carbóxi-pentil)-ureído]-pentanodióico previamente preparado e protegido. O complexo de éster de rênio foi preparado empregando o mesmo procedimento como descrito na experiência geral de rênio. O composto foi desprotegido usando os métodos anteriormente descritos para produzir o produto desejado (2 mg, 20%) como um sólido não totalmente branco. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,8 (d), 8,00 (dd), 7,55 (d), 7,42 (dd), 6,45 (s), 3,95 (m), 3,4-3,6 (m), 2,45 (m), 1,25 (m), 1,1 (m), 0,8 (m). ESMS *m/z*: 931 (M+H)<sup>+</sup>.

Glu-ureia-Lis-PEG4-ReDP:

[Re(CO)<sub>3</sub>{ácido (23R,27S)-17,25-dioxo-1-(piridin-2-il)-2-(piridin-2-ilmetil)-5,8, 11,14-tetraoxa-2,18,24,26-tetraazanonacosano-23,27,29-tricarboxílico }][Br]. (18) (KM11-200).

[0082] O composto de dipiridila de PEG4, ácido (23R,27S)-17,25-dioxo-1-(piridin-2-il)-2-(piridin-2-ilmetil)-5,8,11,14-tetraoxa-2,18,24,26-tetraazanonacosano-23,27,29-tricarboxílico, foi preparado empregando o mesmo procedimento geral como mostrado no Esquema **A**, usando éster di-t-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-carbóxi-pentil)-ureído]-pentanodióico previamente preparado e protegido. O complexo de éster de rênio foi preparado empregando o mesmo procedimento como descrito na experiência geral de rênio. O composto foi desprotegido usando os métodos anteriormente descritos para produzir o produto desejado. (5,1 mg, 29,6%) como um sólido branco. ESMS *m/z*: 1019 (M+H)<sup>+</sup>.

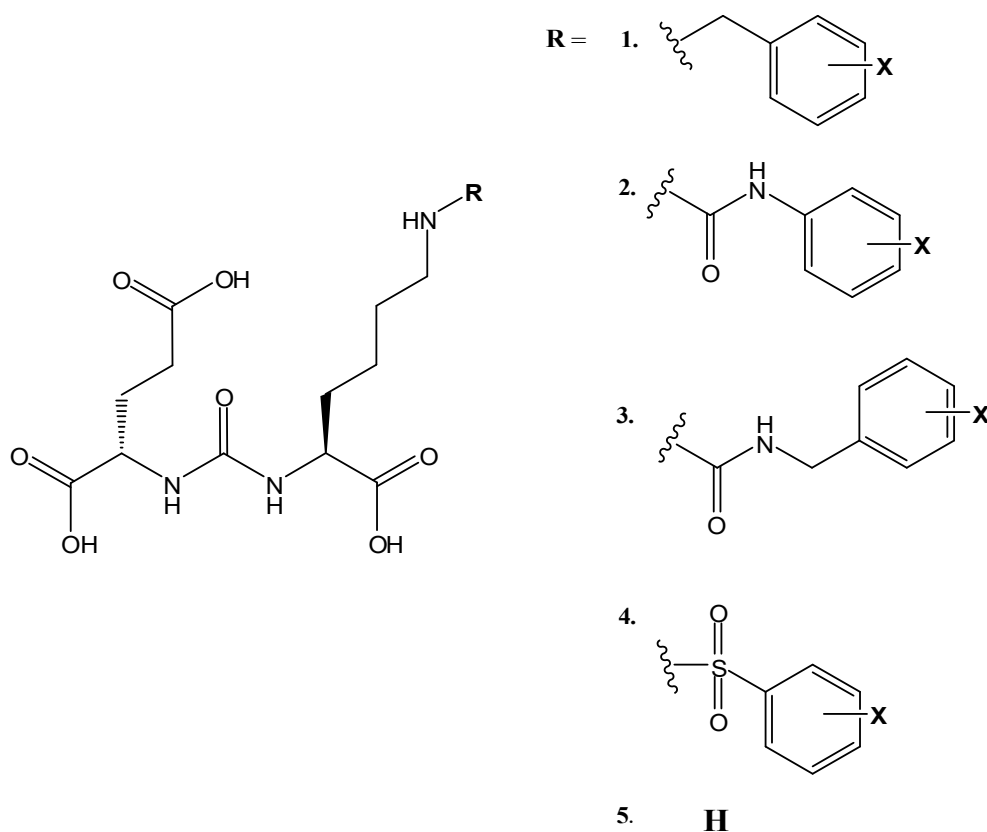
Glu-ureia-Lis-PEG8-ReDP:

[Re(CO)<sub>3</sub>{ácido (35R,39S)-29,37-dioxo-1-(diridina-2-il)-2-(diridina-2-ilmetil)-5,8,11,14,17,20,23,26-octaoxa-2,30,36,38-tetraazaentetracontano-35,39,41-tricarboxílico}][Br]. (19) (MIP-1132).

[0083] O composto de dipiridila de PEG8, ácido (35R,39S)-29,37-dioxo-1-(piridin-2-il)-2-(piridin-2-ilmetil)-5,8,11,14,17,20,23,26-octaoxa-2,30,36,38-tetraazaentetracontano-35,39,41-tricarboxílico foi preparado empregando o mesmo procedimento geral como mostrado no Esquema **A**, usando éster di-t-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-carbóxi-pentil)-ureído]-pentanodióico previamente preparado e protegido. O complexo de éster de rênio foi preparado empregando o mesmo procedimento como descrito na experiência geral de rênio. O composto foi desprotegido usando os métodos anteriormente descritos para produzir o produto desejado (8,0 mg, 30,4%) como um sólido branco. ESMS *m/z*: 1195 (M+H)<sup>+</sup>.

Glu-ureia-Lis-C11PAMA-Re:





X = I, Br, Cl, F, H

[0085] A tabela 1 abaixo é um sumário de inibidores de PSMA sintetizados investigados.

Tabela 1

MIP Nº	X	Descrição de Descrição	IC <sub>50</sub> (nM)
-	-	PMPA	10
1033	-	Glu-ureia-Lis	498
1137	2-Cl	2-Cl-benzila	245
1131	3-Cl	3-Cl-benzila	277
1135	4-Cl	4-Cl-benzil	2
1106	H	Des-halo benzil	2960
1111	H	Des-halo diureia	12
1129	4-Br	4-Br-diureia	2
1110	4-Cl	4-Cl-diureia	4

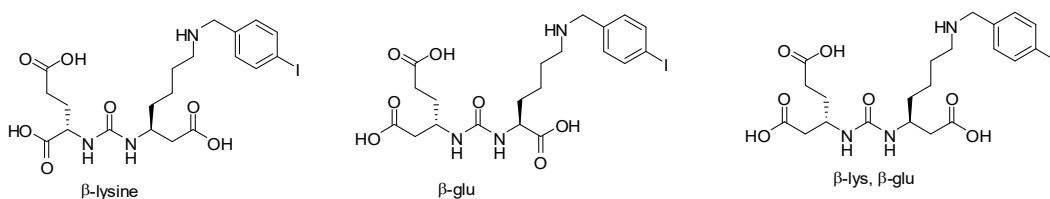
1108	-	2-nafila	154
1101	3-I	3-I-diureia	10
1130	4-di-I	C11 4-di-iodo	300
1133	-	PEG2Re	227
KM11-200	-	PEG4Re	NA
1132	-	PEG8Re	1747
1109	-	C11PAMA-Re	696
1027	4-I	4-I-benzoíla	3*
1095	4-I	4-I-diureia	10*

**Tabela 1.** Sumário de dados de ligação *in vitro* dos derivados de Glu-Ureia-Lis adicionais ou novamente testados.

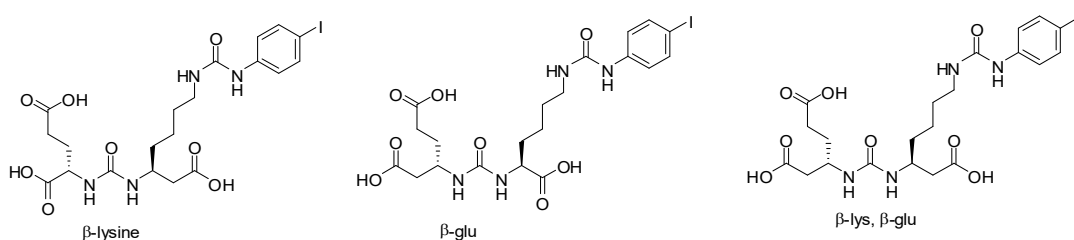
### Análogos de $\beta$ -aminoácido

[0086] Análogos de  $\beta$ -aminoácido de MIP-1072, MIP-1095, MIP-1027 especificamente, porém a extensão a outros análogos tais como os conjugados de tecnécio bem como outros análogos de halogênio é muito desejável. Não temos nenhum novo exemplo para sustentar esta reivindicação no momento.

### Análogos de MIP-1072 $\beta$ -aminoácido



### Análogos de MIP-1095 $\beta$ -aminoácido



### Síntese de Complexos de Modelo de Núcleo de $\{Re(CO)_3\}^{+1}$

[0087] As propriedades do tecnécio e rênio de metais do grupo VII são muito similares devido à sua relação periódica. Foi antecipado que

os metais devem demonstrar química de reação similar, que é frequentemente o caso para a química de tricarbonila, nitrogênio, e tiazol destes dois metais. Igualmente, devido a seu tamanho similar que estabiliza a configuração de elétron  $d^6$  pareado giratório de  $M(I)$ , perrenato e pertecnetato têm procedimentos de reação muito similares. A sintetização do rênio-TECs nos permitiu uma fácil rotina para estruturalmente caracterizar os produtos. A relação periódica entre Tc e Re indica que radiofarmacêuticos de Tc-99m podem ser designados modelando complexos de rênio análogos.

[0088] Alguns dos novos compostos foram sintetizados com quantidades macroscópicas de rênio para caracterização por métodos convencionais, incluindo espectrometria de massa, espectrometria de  $^1H$  e  $^{13}C$  RMN. Seguinte à reação, os complexos de rênio sintetizados foram conduzidos através de uma coluna de HPLC por purificação e identificação de tempos de retenção para comparar com Produtos de reação de Tc. Os complexos de rênio-TEC foram também cristalizados.

[0089] Os complexos de rênio dos inibidores de SAAC são convenientemente isolados das reações dos precursores facilmente disponíveis  $\{Re(CO)_3(H_2O)_3\}^{+1}$  e  $[Net_4]_2[Re(CO)_3Br_3]$  com o inibidor de SAAC. Visto que os grupos doadores fornecidos pelo terminal SAAC são bem documentados como quelantes eficazes para o núcleo de  $\{M(CO)_3\}^{+1}$  e foram designados adotarem uma disposição *facial* requerida em torno do sítio de metal, as preparações dos complexos foram irrepreensíveis.

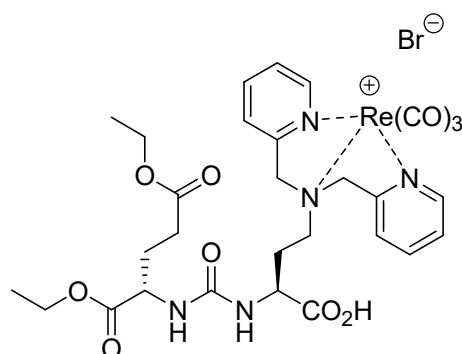
#### Experiência Geral

[0090] O sistema  $\{Re(I)(CO)_3\}^+$  seguiu a química de reação similar àquela do Núcleo de tricarbonila de Tc-99m. O uso de  $[Net_4]_2[ReBr_3(CO)_3]$ , como o material de partida induz à fácil formação do núcleo de *fac*- $\{Re(CO)_3(L)_3\}$ . O  $[Net_4]_2[ReBr_3(CO)_3]$  foi facilmente derivado do  $[ReBr(CO)_5]$ . A síntese dos complexos de Re(I) foi realizada

reagindo  $[\text{Net}_4]_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$  com o ligante de TEC apropriado na relação de 1: 1,2 em 10 ml de metanol. A reação foi deixada aquecer a  $80^\circ\text{C}$  durante 4 horas. Após resfriar todos os seguintes produtos de reação foram todos purificados usando uma pequena coluna de sílica com produções variando de 10-30%.

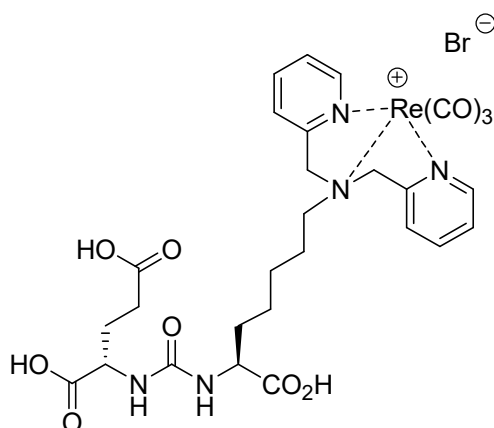
$[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{éster } 2\text{-}\{3\text{-}\{3\text{-}(\text{bis-piridin-2-ilmetil-amino})\text{-1-carbóxi-propil}\}\text{-ureído})\text{-pentanodietílico}] [\text{Br}]$  (24).

[0091]  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,65 (dd, 2H), 7,85 (dd, 2H), 7,7 (dd, 4H), 7,25 (dd, 2H), 6,42 (dd, 1H), 6,0 (dd, 1H), 4,5 (m, 2H), 4,16 (m, 2H), 3,80 (m, 4H), 2,45 (m, 2H), 2,0 (dd, 2H), 1,5 (m, 4H), 1,25 (m, 6H). ESMS  $m/z$ : 812-815.



$[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{ácido } 2\text{-}\{3\text{-}\{5\text{-}(\text{bis-piridin-2-ilmetil-amino})\text{-1-carbóxi-pentil}\}\text{-ureído})\text{-pentanodiólico}] [\text{Br}]$  (25) (MIP 1029).

[0092]  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12,6 (s, 2H), 8,91 (s, 1H), 8,63 (dd, 2H), 7,85 (dd, 2H), 7,75 (dd, 4H), 7,3 (dd, 2H), 6,44 (d, H), 6,28 (d, 1H), 4,45 (s, 2H), 4,10 (m, 2H), 3,15 (s, 1H), 2,60 (m, 2H), 2,25 (m, 2H), 1,90 (m, 1H), 1,78 (m, 2H), 1,45 (m, 2H). ESMS  $m/z$ : 770-774.



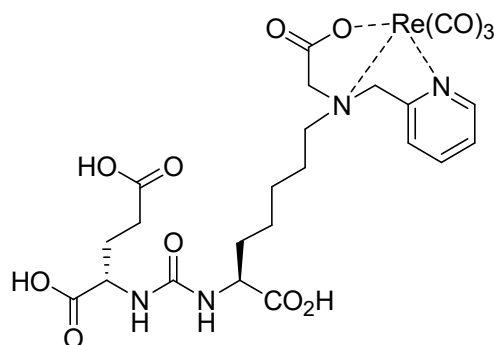
Ácido 2-{3-[1-carbóxi-5-(carboximetil-piridin-2-ilmetil-amino)-pentil]-ureído}-pentanodióico (26).

[0093] O mesmo procedimento geral, usando o éster di-t-butílico de ácido 2-[3-(5-amino-1-carbóxi-pentil)-ureído]-pentanodióico previamente preparado e protegido. O composto foi desprotegido usando os métodos anteriormente descritos (2,2 mg, 65%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,65 (d, 1H), 7,91 (dd, 1H), 7,56 (d, 1H), 7,45 (dd, 1H), 6,31 (m, 2H), 4,34 (s, 2H), 4,08 (m, 4H), 3,10 (m, 2H), 2,24 (m, 2H), 1,95 (m, 1H), 1,68 (m, 4H), 1,5 (m, 1H), 1,22 (m, 2H). ESMS *m/z*: 469 (M+H)<sup>+</sup>.

M+1 469.

[Re(CO)<sub>3</sub>(ácido 2-{3-[1-carbóxi-5-(carboximetil-piridin-2-ilmetil-amino)-pentil]-ureído}-pentanodióico)] (27).

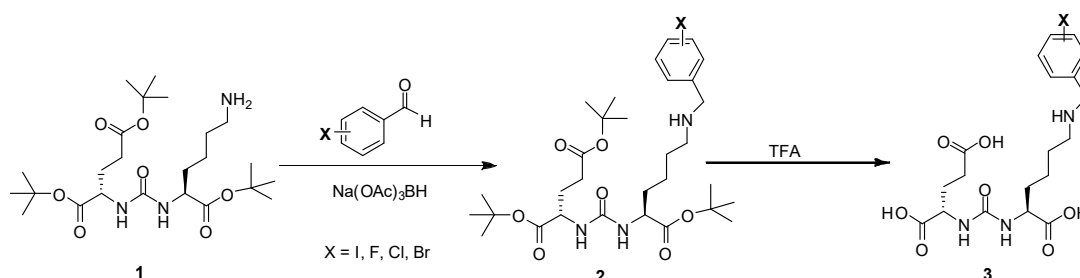
[0094] <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,75 (d, 1H), 8,13 (dd, 1H), 7,69 (d, 1H), 7,57 (dd, 1H), 6,45 (m, 2H), 4,75 (m, 1H), 4,50 (m, 1H), 4,20 (m, 2H), 3,61 (m, 4H), 3,15 (m, 2H), 2,38 (m, 1H), 2,0 (m, 2H), 1,75 (m, 4H), 1,62 (m, 1H), 1,25 (m, 2H). ESMS *m/z* 779-782 (M+2Na)<sup>+</sup>.



Síntese de análogos de Glu-Ureia-Lis (N-benzil-X) (3).

[0095] Os compostos da estrutura geral **3** foram preparados em produções totais variando de 20-40% usando a rotina geral descrita no Esquema **A**. O intermediário sintético chave (**1**) foi reagido com o aldeído apropriado em temperatura ambiente durante uma hora para formar o intermediário de base diridi. A base diridi não foi isolada, porém foi reduzida *in situ* com triacetoxiboroidreto de sódio. Os grupos de

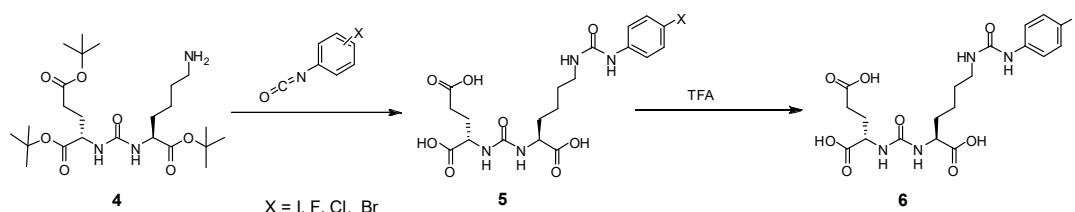
proteção de éster t-butílico foram removidos usando 50% de TFA em DCM durante 1 hora em temperatura ambiente. Na conclusão da desproteção, as reações foram concentradas em um evaporador giratório e purificadas por HPLC ou cromatografia *flash* para fornecer o produto desejado (**3**) em 40-80 % de produção.



**Esquema A.** Séries de reação gerais para a síntese de análogos de Glu-Ureia-Lis(*N*-benzil-X) halogenados (**3**).

#### Síntese de análogos de Glu-Ureia-Ureído (Fenil-X)

[0096] Os seguintes compostos da estrutura geral **8** foram preparados em produções totais variando de 20-60% pela rotina descrita no Esquema **B**. O intermediário sintético chave (**4**) foi reagido com o fenilisocianato apropriado em temperatura ambiente para fornecer os intermediários protegidos desejados (**5**) em boas produções. Os grupos de proteção de éster t-butílico foram removidos na presença de 50% de TFA em DCM durante 1 hora em temperatura ambiente. Na conclusão, as reações foram concentradas em um evaporador giratório purificado por HPLC ou recristalização para fornecer o produto desejado (**6**) em 40-90% de produção.



**Esquema B.** Séries de reação gerais para a síntese de análogos de Glu-Ureia-Ureído(Fenil-X) halogenados.

#### Preparação e Caracterização dos Complexos Radiorrotulados

##### Rotulagem de Tecnécio-99m

[0097] Preparação dos complexos radiorrotulados complexos rotulados de  $^{99m}\text{Tc}$ - foram obtidos por adição de 100  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  a 500  $\mu\text{L}$  de  $10^{-4}$  M de soluções do inibidor SAAC. As misturas foram aquecidas a  $70^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Os produtos foram analisados por sua pureza radioquímica por HPLC de fase reversa.

[0098] A estabilidade dos compostos radiorrotulados em solução e em soro foi determinada como função de condições de solução e tempo. Especificamente, após radiorrotulagem e isolamento, o produto foi armazenado em temperatura ambiente durante 6 horas após o que a análise de HPLC foi realizada para checar quanto ao grau de retenção de rótulo, bem como degradação de produto potencial. A nova formação de  $\text{TcO}_4^-$  e a presença do material reduzido  $\text{TcO}_2$  foram analisados.

[0099] Para ajudar na predição da estabilidade *in vivo*, desafios de ligante foram realizados. Especificamente, as estabilidades dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  foram investigadas incubando os complexos purificados por HPLC em 5% de soro de camundongo em temperatura ambiente e  $37^\circ\text{C}$ . A capacidade dos ligantes de competição, tais como cisteína e DTPA, para extrair Tc-99m dos complexos foi estudada incubando-se os complexos purificados com soluções (PBS pH 7,2) contendo ligantes de competição em concentrações finais de 0,1 M.

[00100] Os resultados dos estudos de competição de rotulagem não demonstraram nenhuma degradação dos complexos de Tc-99m por até 6 horas no soro ou no estudo de ligantes de competição. Os resultados da incubação a  $37^\circ\text{C}$  após 6 horas são mostrados na Figura 2.

#### Iodinações de DCT

[00101] A preparação do composto rotulado por iodina-131 N-[N-[(S)-1,3-dicarboxipropil]carbamoil]-S-3-iodo-L-tirosina (I-131-DCIT) foi obtida por adição de 100  $\mu\text{L}$  de  $[\text{I-131}] \text{NaI}$  em 0,1 N de NaOH a uma solução de PBS (pH 7,2) contendo DCT (1mg/mL) em um tubo

Iodogen® (Fisher Scientific, Pierce). A mistura foi vortexada durante 3 minutos e armazenada em temperatura ambiente durante 20 minutos.

[00102] A estabilidade do composto radiorrotulado em solução foi determinada como uma função de tempo. Especificamente, após radiorrotulagem e isolamento, o produto foi armazenado em temperatura ambiente durante 48 horas após a análise de HPLC que foi realizada para checar quanto ao grau de retenção de rótulo, bem como a degradação de produto potencial. A nova formação de NaI e a presença dos iodatos reduzidos foram analisadas. Os resultados do estudo de estabilidade de rotulagem não demonstraram nenhuma degradação do I-131 DCIT por até 2 dias em temperatura ambiente. Os resultados do estudo são mostrados na Figura 3.

[00103] A preparação do composto rotulado por iodina-131 ácido 2-{3-[1-carbóxi-5-(4-iodo-benzoilamino)-pentil]-ureído}-pentanodióico (I-131-MIP 1072) foi obtida por adição de 100 µl de [I-131] NaI em 0,1 N de NaOH com 30 µl de metanol com 0,5% de ácido acético a uma solução de PBS (pH 7,2) contendo MIP 1072 (1mg/mL) em um tubo IODOGEN (Fisher Scientific). A mistura foi vortexada durante 3 minutos e armazenada em temperatura ambiente durante 20 minutos.

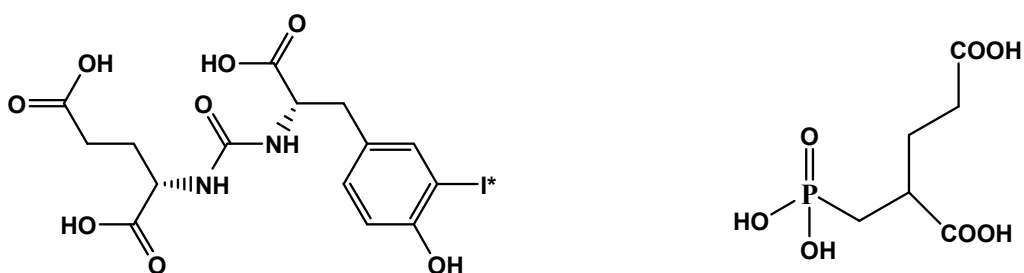
[00104] A estabilidade do composto radiorrotulado em solução foi determinada como uma função de tempo. Especificamente, após radiorrotulagem e isolamento, o produto foi armazenado a 37°C durante 3 dias após o que análise de HPLC foi realizada para checar quanto ao grau de retenção de rótulo, bem como degradação de produto potencial. A nova formação de NaI e a presença dos iodatos reduzidos foram analisadas. Os resultados do estudo de estabilidade de rotulagem não demonstraram nenhuma degradação significativa do I-131 1072 por até 3 dias em temperatura ambiente em DMSO, 10% de etanol/salina, PBS pH 7,2, e 6% de ascorbato/3% de solução de ácido gentísico. Os resultados do estudo são mostrados na Figura 4.

### Caracterização Biológica de Conjugados de SAAC-Ureia-Glutamato

[00105] Os conjugados de SAAC-ureia-Glu recentemente preparados foram analisados em um ensaio de ligação de célula de câncer de próstata humano usando células LnCap, positivas de PSMA, e células PC3, negativas de PSMA. Compostos demonstrando captação específica ou ligação às células positivas de PSMA serão estudos para a localização de tumor *in vivo*.

[00106] Ensaio de avaliação fria *in vitro* versus I-131 DCIT. As células câncer de próstata humano LnCap e PC3 foram obtidas de American Type Culture Collection, Rockville, MD. As células LnCap foram mantidas em meio de RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS). As células PC3 foram desenvolvidas em meio de F12K suplementado com 10% de FBS. A ligação do composto radiorrotulado e competição com derivados frios de células LnCap e PC-3 foram realizadas de acordo com os métodos de Tang e outro. (Tang, H.; Brown, M.; Ye, Y.; Huang, G.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Zhai, H.; Chen, X.; Shen, T.Y.; Tenniswood, M., *Prostate targeting ligands based on N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003, 307, 8-14) com modificações apropriadas. As células foram semeadas em placas de 12 cavidades em aproximadamente  $4 \times 10^5$  células/cavidades e incubadas durante 48 horas em um incubador umidificado a 37°C/5% de dióxido de carbono antes da adição do composto. Cada conjugado de SAAC-ureia-Glu único foi preparado e diluído em meio de cultura celular livre de soro contendo 0,5% de albumina de soro bovino (BSA) em combinação com 3nM de I-131 DCIT (inibidor conhecido). A ligação total foi determinada incubando-se I-131 DCIT sem composto teste. As placas foram incubadas em temperatura ambiente durante 1 hora. As células foram removidas das placas pipetando-se suavemente e transferidas para tubos Eppendorff. As amostras foram microcentrifugadas durante 15 segundos a 10K x g. O

meio foi aspirado e a pélete foi lavada duas vezes por dispersão em meio de ensaio fresco seguido por microcentrifugação. A ligação celular de I-131 DCIT foi determinada por contagem da pélete celular em uma contadora gama automatizada. A ligação não específica foi determinada como as contas associadas com as células após incubação com 2  $\mu\text{M}$  de composto não radiorrotulado ou ácido 2-fosfometil-pentanodióico (PMPA). Os compostos de controle são descritos abaixo.



#### Compostos de Controle

[00107] Os dois compostos chave para os ensaios de ligação, são mostrados acima: o I-DCIT (Kozikowski e outro) e ácido 2-fosfometil-pentanodióico (PMPA – direita), um inibidor potente com  $\text{IC}_{50} = 6 \text{ nM}$ .

#### (ii) Avaliação de dose in vitro.

[00108] I-131 DCIT especificamente ligado às células LnCap e não às células PC3 como é evidente pelas contas removíveis por composto não radiorrotulado ou PMPA em células LnCap apenas (figura 5). As ligações constantes foram determinadas incubando-se células LnCap com várias quantidades de DCIT não radiorrotulado na presença de uma quantidade constante de I-131 DCIT e dividindo-se pela atividade específica de cada solução para determinar o número de fmols da ligação de composto (figura 6). O KD foi determinado ser 264 nm e  $b_{\text{max}}$  foi 254 fmols. Os compostos MIP-1008 e MIP-1033 que a 2  $\mu\text{M}$  competiram com I-131 DCIT para ligação às células LnCap, foram testados novamente em várias doses para determinar os valores de  $\text{IC}_{50}$  (as figuras 7 e 8). Enquanto MIP-1072, MIP-1095, e MIP-1097 exibiram valores de  $\text{IC}_{50} < 50 \text{ nm}$  os compostos MIP-1008 e MIP-1033 exibiram  $\text{IC}_{50}$ s de 98 nm e 497 nm, respectivamente. Os compostos

MIP-1025, MIP-1028, e MIP-1029 não competem para a ligação (tabela 1).

[00109] A fim de confirmar os resultados da análise Scatchard da Figura 7 indicando a internalização de MIP-1072 nas células LnCap, a taxa de captação de MIP-1072 em células LnCap foi monitorada. Cada célula foi dosada com 100 nM de MIP-1072 (2 uCi/cavidade) a 4°C e 37°C. A ligação ao PSMA alcançou equilíbrio após 15 minutos como evidenciado pelo platô na curva a 4°C. As células incubadas a 37°C continuaram internalizar MIP-1072 após o equilíbrio ter sido alcançado. Este resultado, Figura 10, confirma a Scatchard e indica que MIP-1072 é realmente internalizado.

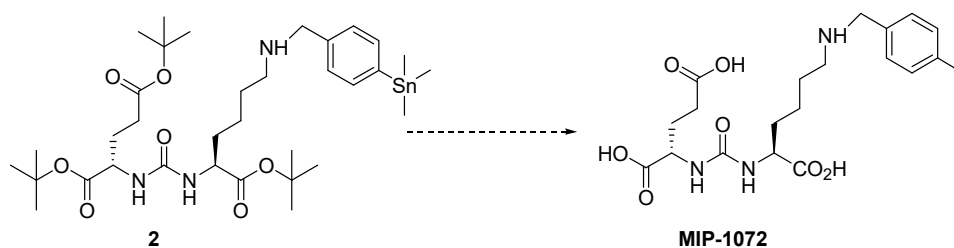
### (iii) Experiência de Ensaio de Microssoma

[00110] Microssomas de fígado de rato macho agrupados (1 mg/mL, BD Biosciences), sistema de regeneração de NADPH (1,3 mM de NADP, 3,3 mM de desidrogenase de 6-fosfato de glicose e 0,4 U/mL de 6-fosfato de glicose, BD Biosciences) e composto teste (50 µM de MIP-1072, 50 µM de DCT, e 100 µM de fenacetina) foram adicionados a um tampão de fosfato de potássio de 0,1 M (pH 7,4) a fim de monitorar a degradação catastrófica dos compostos teste. A mistura foi incubada a 37°C e no tempo indicado (0, 15, 60 min) a reação foi interrompida pela adição de um volume igual de metanol gelado (500 µL). A suspensão resultante foi em seguida centrifugada a 21,000xG durante 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e injetado em um MSD SL modelo Agilent LCMS usando um gradiente 95:5 água:acetonitrilo (com 0,1% de ácido fórmico) para 40:60 água:acetonitrilo (com 0,1% de ácido fórmico) e monitorando o íon origem apenas modo de íon simples. Os resultados, mostrados nas Figuras 11A e 11B, são expressos como a degradação do íon origem com respeito ao ponto de tempo mínimo.

[00111] A estabilidade de MIP-1072 foi avaliada usando microssomas de fígado de rato. MIP-1072 (50 µM) e Fenacetina (100

$\mu\text{M}$ ) foram incubados com microsomas de fígado de rato a  $37^\circ\text{C}$  durante o tempo indicado. Fenacetina foi usada como uma substância de controle que é conhecida metabolizar-se. MIP-1072 não foi degradado pelos microsomas de fígado de rato durante o período de incubação. Entretanto, fenacetina foi degradada por 22% após uma incubação de 60 minutos.

[00112] O composto de chumbo, MIP 1072, foi rotulado por I-131 para estudos de distribuição de tecido em camundongos tanto com tumores de LnCap (positivos de PSMA) quanto PC3 (negativos de PSMA) implantados. O composto foi radiorrotulado pela rotina mostrada abaixo.



[00113] Os resultados de biodistribuição de tecido foram consistentes com os dados *in vitro*, e demonstraram captação significativa nos tumores de LnCap (positivos de PSMA). Os resultados também exibiram um grau elevado de especificidade com muito pouca atividade nos tumores de PC3 (negativos de PSMA). Um gráfico descrevendo a distribuição de camundongos é mostrado abaixo (figura 12).

[00114] As avaliações biológicas usando N-[N-[(S)-1,3-dicarboxipropil] carbamoi]-S-3-iodo-L-tirosina (I-131-DCIT) versus complexos "frios" provaram ser uma rápida primeira avaliação, seguida por curvas de dose para determinar os valores de  $\text{IC}_{50}$  precisos. A série de compostos de chumbo que exibiram valores de  $\text{IC}_{50} < 50\text{nM}$ . Dados *in vivo* da série de chumbo demonstraram alta afinidade, com acúmulo de 3% ID/g nos tumores de LnCap, e alta especificidade com a relação LNCaP para o-PC3 excedendo 15 para 1.

Protocolo de Lise de Célula LNCaP

- [00115] 2 Frascos T75 confluentes
- [00116] Retirar as células da placa por pipetagem ascendente e descendente com retirada das células por meio de pipetagem ascendente e descendente.
- [00117] Lavar com 0,32 M de sacarose, recentrifugar
- [00118] Ressuspender a pélete celular em 1 mL de 50 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 0,5% de Triton X-100
- [00119] Centrifugar a 14000 rpm durante 1 minuto para precipitar os núcleos
- [00120] Remover o sobrenadante e dividir em alíquotas de 50 uL
- [00121] Armazenar a -80C

Ensaio de Proteína:

- [00122] Proteína Bio-Rad Padrão II – 1,44 mg/ml
- [00123] Visto que usando detergente na etapa de lise, preparar o reagente de trabalho, A' adicionando 20 uL de reagente S a cada 1 mL de reagente A que será necessário para a realização. (Se um precipitado forma-se, aquecer e centrifugar)
- [00124] Preparar 5 diluições de proteína – 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 mg/mL
- [00125] Também preparar diluições de 1/10, 1/100, e 1/1000 do desconhecido
- [00126] Combinar 25 µL padrão/desconhecido, 100 µL de A', 800 µL de reagente B em duplicata. Misturar.
- [00127] Após ~15 minutos avaliar a absorvência a 750 nM

Ensaio de NAALADase:

- [00128] Tampão Rxn: 50 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 20 mM de CoCl<sub>2</sub>, 32 mM de NaCl
- [00129] Fazer NAAG frio (100 mM de matéria prima) diluir 1/100 em Tampão de Rxn para 1 mM
- [00130] Combinar 600 uL de tampão e lisado de célula LnCap (200

µg) Pré-incubar durante 3 minutos a 37°C

[00131] Pré-incubar o tampão de Rxn e lisado de célula LnCap durante 3 minutos a 37°C

[00132] Adicionar 6 µL de 1 mM de NAAG (para 1 µM de concentração final) reforçado com 1,000,000 CPM de <sup>3</sup>H-NAAG (100 µL de 1 mM de NAAG + 10µL de 3H-NAAG (10 µCi)). Para competição adicionar PMPA.

[00133] Incubar durante 30 minutos

[00134] No tempo indicado, interromper a reação removendo 100 uL da mistura reacional e adicionando um volume igual de 0,25 M de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> gelado, pH 4,3 para interromper o rxn

[00135] Aplicar ½ de mistura a 250 mg de coluna de permuta de cátion AG 50W-X4 (200-400 malhas, forma H<sup>+</sup>, dilatar a resina com DI H<sub>2</sub>O antes de usar). Salvar a outra ½ para contagem.

[00136] Lavar a coluna com 500 µL 1:1 tampão Rxn /0,25MKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

[00137] Eluir com 3M de KCl (1,5 mL)

[00138] Contar 100 uL da carga, eluição e reação (diluídos 1:6) para minimizar a extinção

#### OBSERVAÇÕES:

Tempo = Os valores de controle serão subtraídos de pontos de tempo experimentais

[00139] Resultados expressos como pmol <sup>3</sup>H-glutamato formado/min/mg de proteína

[00140] Grant diz apenas 10 minutos para assegurar a linearidade, embora Luthi-Carter, e outro (J Pharm Exp Therap 1998 286(2)) digam 2 horas ainda nenhum efeito na linearidade, e menos do que 20% do substrato consumido.

#### Tratamentos Terapêuticos

[00141] Os compostos da presente invenção podem ser usado para inibir NAALADase para tratamentos terapêuticos. Doenças que podem

ser receptivas ao tratamento de NAALADase incluem neuropatia diabética dolorosa e sensória, dano neuronal e câncer de próstata, esquizofrenia, câncer colorretal, inflamação, esclerose lateral amiotrófica, ou neuropatia diabética. Os presentes compostos podem também ser usados como um analgésico. A orientação para a modelagem de tais tratamentos terapêuticos pode ser encontrada em Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw Hill, 10ª Edição, 2001, Pharmaceutical Preformulation and Formulation: A Practical Guide of Candidate Drug Selection to Commercial Dosage Form, CRC, 2001 e Handbook of Pharmaceutical Excipients, AphA Publicações, 5ª Edição, 2005.

#### Ligação Competitiva de Análogos (figura 16)

[00142] A capacidade dos análogos não radioativos competirem com  $^{131}\text{I}$ -DCIT para ligação ao PSMA foi testada nas células LnCap, linhagem celular de câncer de próstata humano positivas de PSMA. As células LnCap (300,000 células/cavidade) foram incubadas durante 1 hora com 3 nM [ $^{131}\text{I}$ ]-DCIT na presença de 1-10,000 nM de MIP-1072 em meio de RPMI-1640 suplementado com 0,5% de albumina de soro bovino, em seguida lavadas e contadas em uma contadora gama. Todos os documentos citados nesta especificação incluindo Pedidos de Patente são incorporados por referência em suas totalidades.

#### Internalização e Ligação Direta de MIP-1072

[00143] A ligação direta de  $^{123}\text{I}$ -MIP-1072 às células de câncer de próstata foi examinada (figura 17). As células LnCap, ou as células PC3, linhagem celular negativa de PSMA, foram incubadas em meio de RPMI-1640 suplementado com 0,5% de albumina de soro bovino durante 1 hora com 3 nM de  $^{123}\text{I}$ -MIP-1072 sozinho, ou na presença de 10  $\mu\text{M}$  de MIP-1072 não rotulado, ou 10  $\mu\text{M}$  de ácido 2-(fosfonometil)-pentanodióico (PMPA), um inibidor de NAALADase estruturalmente não relacionado. As células foram lavadas e contadas em uma contadora

gama.

[00144] A afinidade constante ( $K_d$ ) de MIP-1072 foi determinada por análise de ligação de saturação (figura 18). As células LnCap foram incubadas durante 1 hora com 30-100,000 pM de  $^{131}\text{I}$ -MIP-1072 em HBS (50 mM de Hepes, pH 7,5, 0,9% de cloreto de sódio) a 4°C ou 37°C na ausência ou presença de 10  $\mu\text{M}$  de MIP-1072 não rotulado (para determinar ligação não específica). As células foram em seguida lavadas e a quantidade de radioatividade foi avaliada em uma contadora gama. A ligação específica foi calculada como a diferença entre a ligação total e a ligação não específica. A afinidade constante ( $K_d$ ) da interação de MIP-1072 com PSMA nas células LnCap foi determinada por análise de ligação de saturação realizada titulando-se  $^{123}\text{I}$ -MIP-1072 (3 pM – 1,000 nM) na presença e ausência de um excesso de MIP-1072 não radiorrotulado (10  $\mu\text{M}$ ). Um  $K_d$  de 4,8 nM, e  $B_{\text{max}}$  de 1,490 fmoles/ $10^6$  de células 4°C foi determinado por análise de regressão não linear usando *software* Graph Pad Prism (figura 18). O  $K_d$  não foi significativamente diferente a 37°C, 8,1 nM. O  $B_{\text{max}}$ , entretanto, foi maior a 37°C do que a 4°C; 1,490 vs. 4,400 fmol/ $10^6$  de células, respectivamente, indicando internalização de MIP-1072. Os resultados abaixo são representativos de duas análises independentes.

[00145] A capacidade de MIP-1072 internalizar em células LnCap foi confirmada por um ensaio de lavagem de ácido (figura 19). As células LnCap foram incubadas em HBS com 100 nM de  $^{123}\text{I}$ -MIP-1072 durante 0-2 horas a 4 e 37°C. No tempo indicado os meios foram removidos e as células foram incubadas em tampão de ácido brando (50 mM de glicina, 150 mM de NaCl, pH 3,0) a 4°C durante 5 minutos. Após a breve incubação as células foram centrifugadas a 20,000 x g durante 5 minutos. O sobrenadante e a pélete celular foram contada em uma contadora gama. A fim de confirmar os resultados da análise de ligação de saturação indicando a internalização de MIP-1072 em células LnCap,

monitoramos a taxa de captação de MIP-1072 em célula LnCap. Cada cavidade foi dosada com 100 nM de MIP-1072 (2 uCi/cavidade) a 4°C e 37°C. A ligação ao PSMA alcançou equilíbrio após 15 minutos como evidenciado pelo platô na curva a 4°C. As células incubadas a 37°C continuaram internalizar MIP-1072 após o equilíbrio ter sido obtido. Os resultados mostraram um aumento insensível do ácido, dependente do tempo em radioatividade associada com as péletes a 37°C, porém não a 4°C, indicando que  $^{123}\text{I}$ -MIP-1072 é internalizado a 37°C porém, não a 4°C (figura 19).

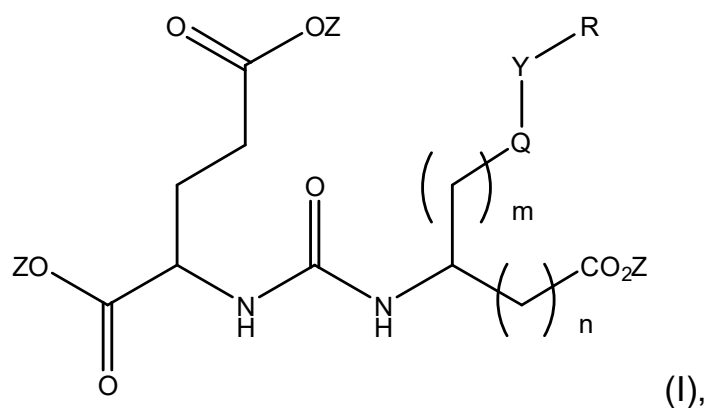
#### Captação de Tumor e Distribuição de Tecido de $^{123}\text{I}$ -MIP-1072

[00146] Uma análise quantitativa da distribuição de tecido de  $^{123}\text{I}$ -MIP-1072 foi realizada em grupos separados de camundongos NCr nus<sup>-/-</sup> machos transportando xenoenxertos de LnCap positivos de PSMA (aproximadamente 100-200 mm<sup>3</sup>) administrado por meio de veia da cauda como uma injeção de bolo (aproximadamente 2 µCi/camundongo) em um volume constante de 0,05 ml. Os animais (n=5/ponto de tempo) foram eutanizados por asfixiação com dióxido de carbono a 0,25, 1, 2, 4, 8, e 24 horas após injeção. Tecidos (sangue, coração, pulmões, fígado, baço, rins, glândulas suprarrenais, estômago, intestinos grossos ou delgados (com teores), testes, músculo esquelético, ossos, cérebro, adiposo, e tumor) foram dissecados, excisados, pesados úmidos, transferidos para tubos plásticos e contados uma  $\gamma$ -contadora automatizada (Modelo LKB 1282, Wallac Oy, Finlândia). Para comparar a captação de  $^{123}\text{I}$ -MIP-1072 em LnCap versus tumores de PC3, e para demonstrar que o composto foi no mecanismo por meio de competição com ácido 2-(fosfonometil)-pentanodióico (PMPA), alguns camundongos transportando xenoenxertos de LnCap ou PC3 foram pré-tratados com 50 mg/kg de PMPA 5 minutos antes da injeção com  $^{123}\text{I}$ -MIP-1072 e tecidos selecionados foram colhidos em 1 hora após injeção. Captação e

exposição de MIP-1072 foram maiores no xenoinxerto de LnCap e rim que expressam níveis elevados de PSMA. O pico de captação no rim foi de  $158 \pm 46$  %ID/g em 2 horas e do enxerto de LnCap foi  $17 \pm 6$  %ID/g em 1 hora (figura 20). A captação nestes tecidos alvos foi rápida, ao passo que o desgaste foi mais lento no enxerto de LnCap.  $^{123}\text{I}$ -MIP-1072 foi demonstrado ser no mecanismo *in vivo* como evidenciado pela localização para tumores de LnCap expressando PSMA porém não tumores de PC3 que não expressam PSMA (figura 21). Além disso, tanto o tumor e os rins foram bloqueados por pré-tratamento dos camundongos com PMPA, um inibidor potente de PSMA.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composto, caracterizado pelo fato de que apresenta a Fórmula (I):



na qual

R é uma  $C_6-C_{12}$  arila substituída ou não-substituída, sendo que o termo arila se refere a um grupo aromático que apresenta um ou mais anéis tendo um sistema pi elétron conjugado e inclui grupo arila carbocíclica, arila heterocíclica e biarila; ou  $-NR'R'$ ;

Q é  $NR'$ ;

Y é  $C(O)$ ,  $S(O)_2$ , ou  $CH_2$ ;

Z é H ou  $C_1-C_4$  alquila;

m é 1, 2, 3, 4, ou 5; e

n é 0;

$R'$  é independentemente H, uma  $C_6-C_{12}$  arila substituída ou não-substituída, uma  $C_3-C_{12}$  heteroarila substituída ou não-substituída ou uma  $C_1-C_6$  alquila substituída ou não-substituída;

quando substituídas, arila, heteroarila e alquila são substituídas com halogênio,  $C_6-C_{12}$  heteroarila,  $-NR'R'$  ou  $COOZ$ ;

sendo que

(i) um de R ou  $R'$  é uma  $C_6-C_{12}$  arila ou  $C_3-C_{12}$  heteroarila substituída com um halogênio; ou

(ii) um de R ou  $R'$  é uma  $C_3-C_{12}$  heteroarila,

ou um sal farmacologicamente aceitável do composto de Fórmula (I), sendo que o termo sal farmacologicamente aceitável se refere àqueles sais que retêm as propriedades e eficácia biológica das bases livres e são obtidos por reação com ácidos inorgânicos.

2. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o halogênio é um radiohalogênio.

3. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que:

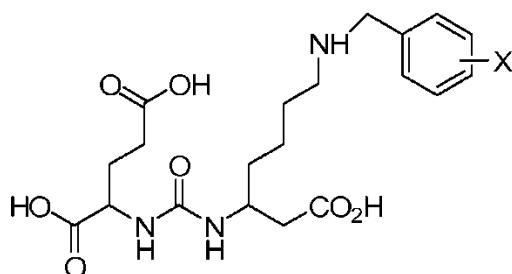
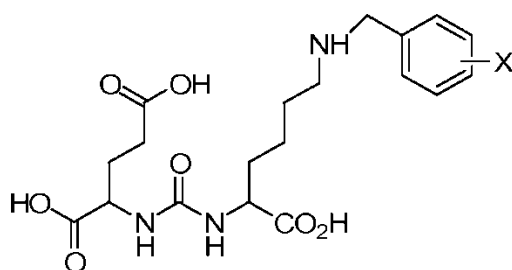
m é 1, 2, 3 ou 4;

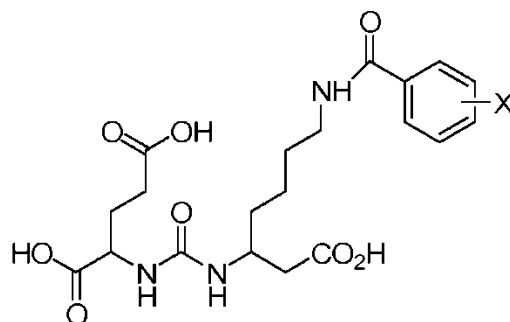
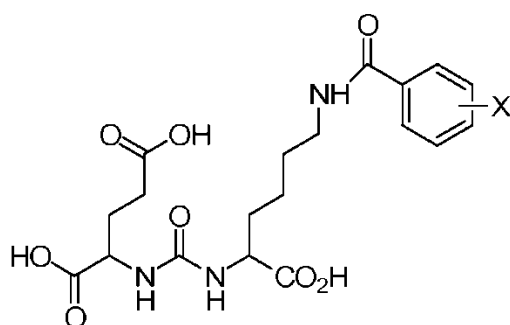
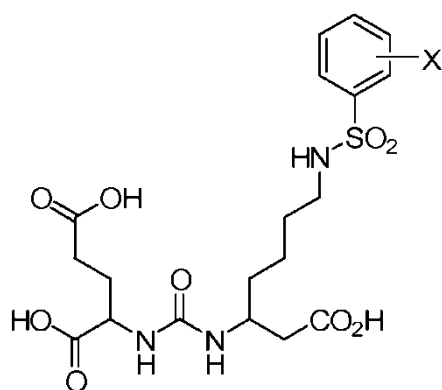
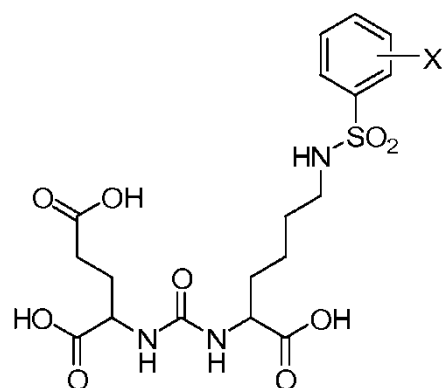
Y é C(O) ou CH<sub>2</sub>; e

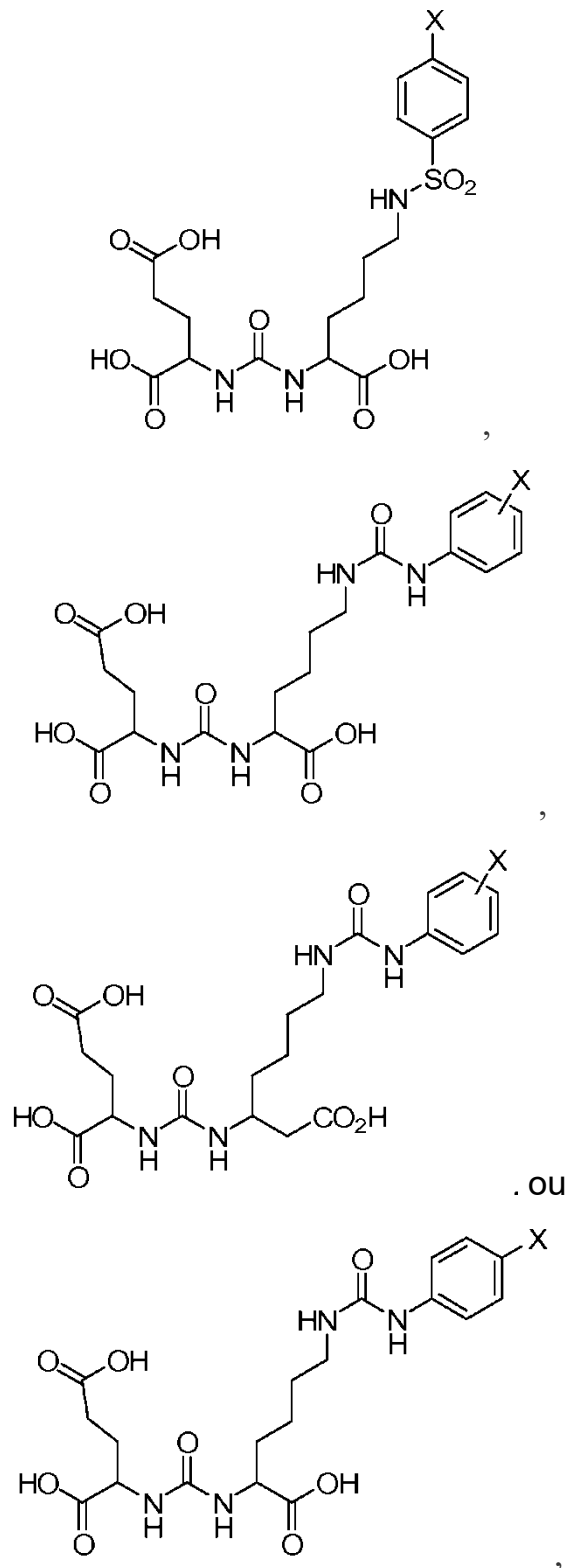
R é uma C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> arila substituída ou não-substituída.

4. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que R é um grupo fenila, que é um tipo de grupo arila substituída com um halogênio.

5. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é:





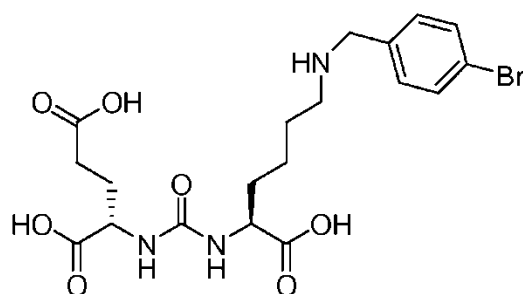
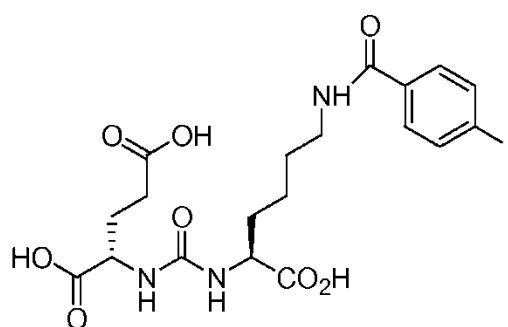
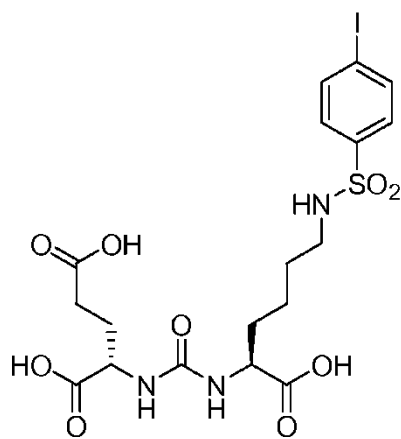
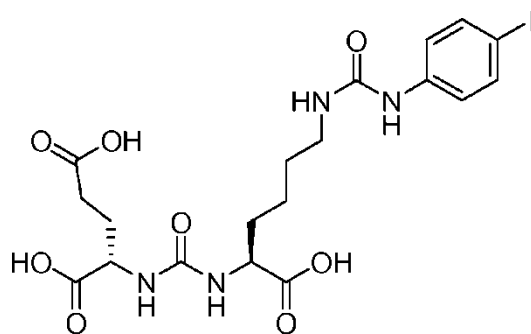


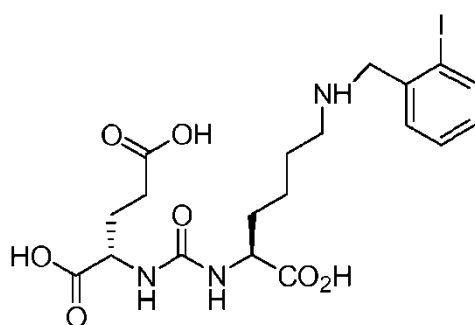
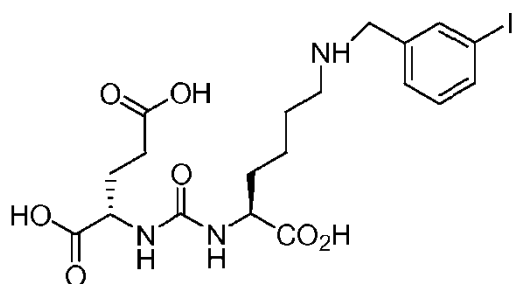
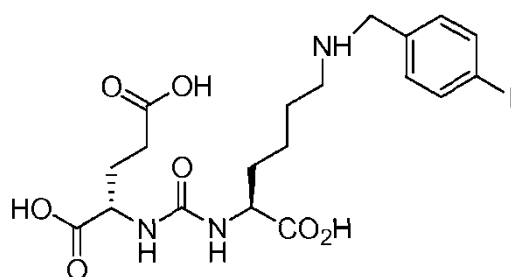
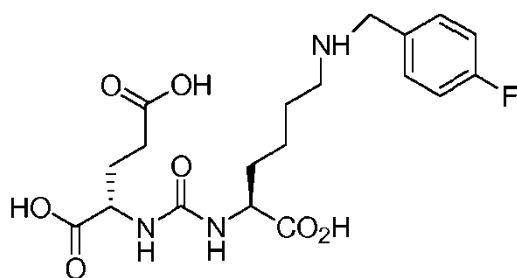
nos quais

o hidrogênio dos grupos carbóxi de qualquer dos compostos acima podem ser substituídos com C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquila, e

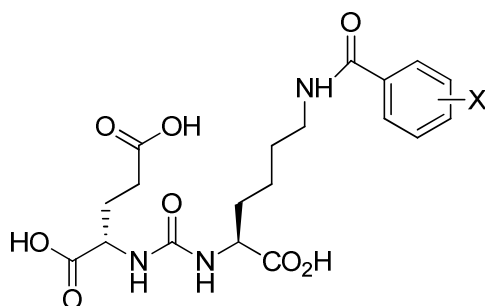
X é selecionado do grupo que consiste em halogênio, radiohalogênio, I-123, I-125, I-131, I-124, Br-75, Br-77 e F-18.

6. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é:





7. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que apresenta a seguinte estrutura:



na qual

o hidrogênio dos grupos carbóxi do composto ou sal podem ser substituídos com C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquila; e

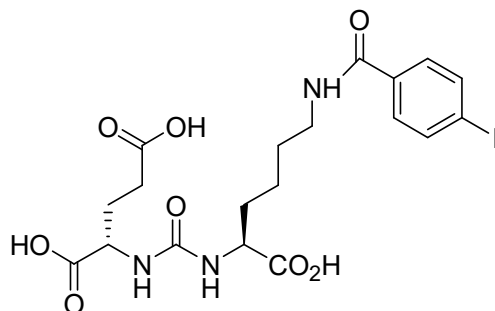
X é selecionado dentre halogênio e H.

8. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o halogênio é um radiohalogênio.

9. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que X é selecionado do grupo consistindo em: I, Br, Cl, F, I-123, I-125, I-131, I-124, Br-75, Br-77, F-18 e H.

10. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que X é I-123, I-125, I-131 ou I-124.

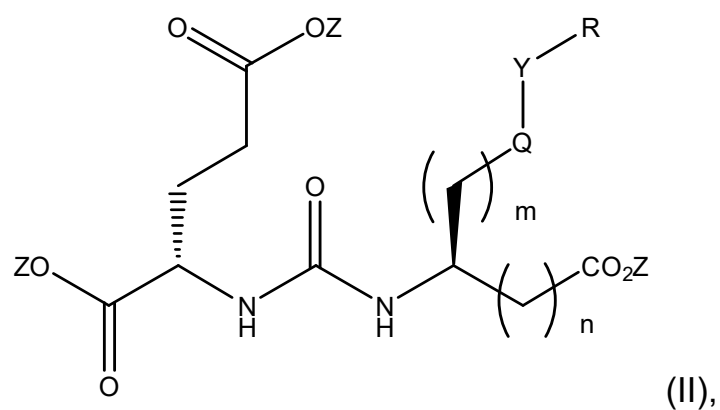
11. Composto, ou sal de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que apresenta a fórmula:



12. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o radiohalogênio é um radiohalogênio de imageamento.

13. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o radiohalogênio é I-123, I-125, I-131, I-124, Br-75, Br-77 ou F-18.

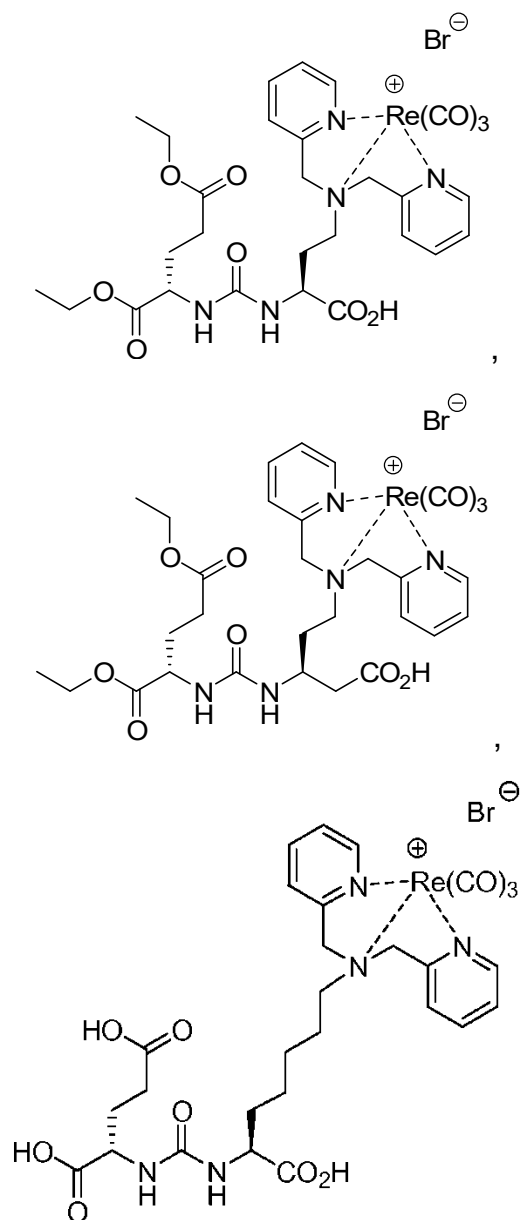
14. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que apresenta a Fórmula (II):

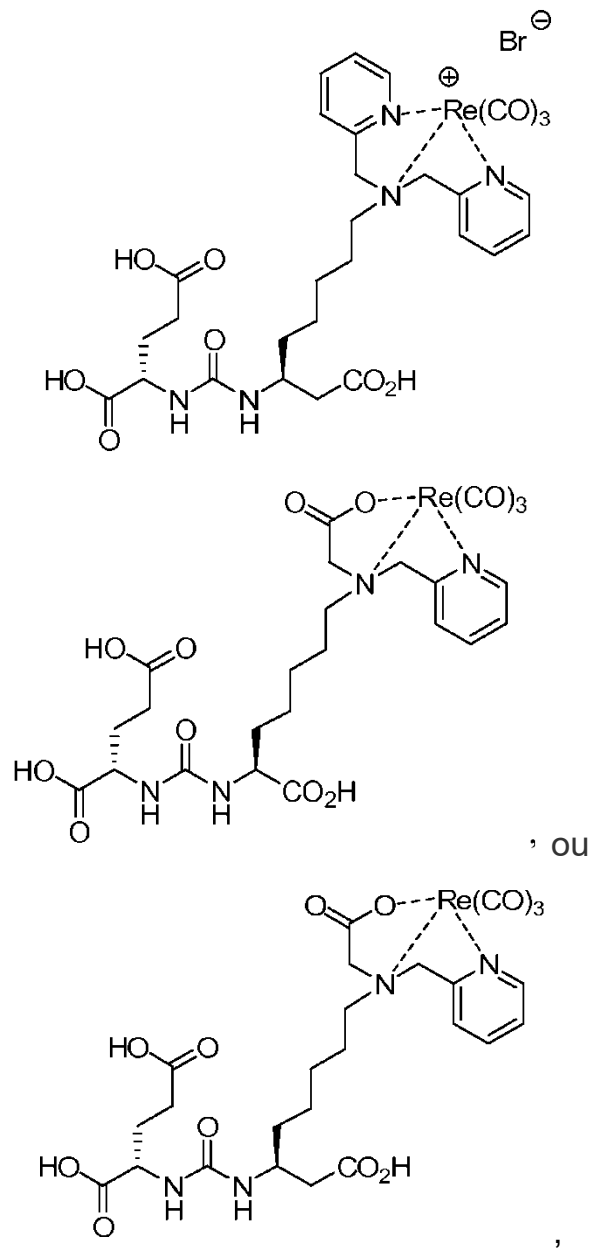


na qual

R, Q, Y, Z, m e n são como definidos na reivindicação 1.

15. Composto, caracterizado pelo fato de que é:





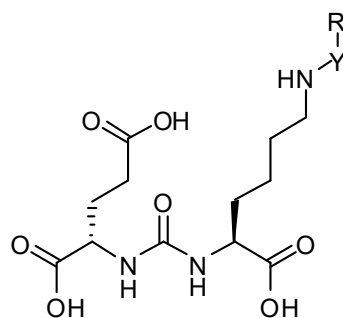
nas quais

os grupos carbóxi de qualquer dos compostos acima podem ser substituídos com C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquila.

16. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) composto, ou sal, como definido na reivindicação 1, conjugado a uma porção de quelação de metal, tecnécio-99m, rênio-186 ou rênio-188.

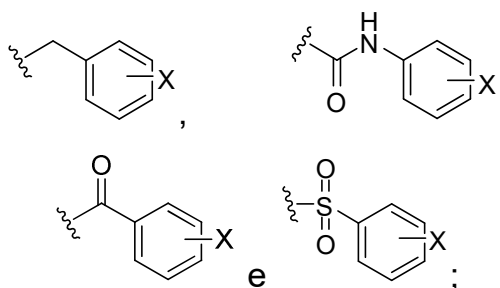
17. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que apresenta a Fórmula (lib):



(lib)

na qual

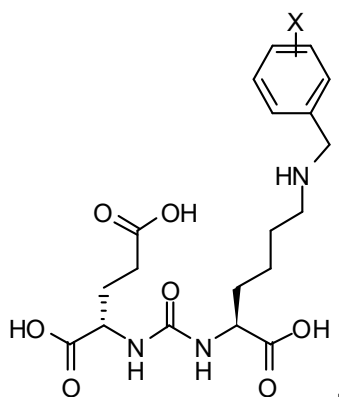
-Y-R é selecionado do grupo que consiste em:



nas quais

X é selecionado do grupo que consiste em: I, Br, Cl, F, e H.

18. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o composto apresenta seguinte estrutura:

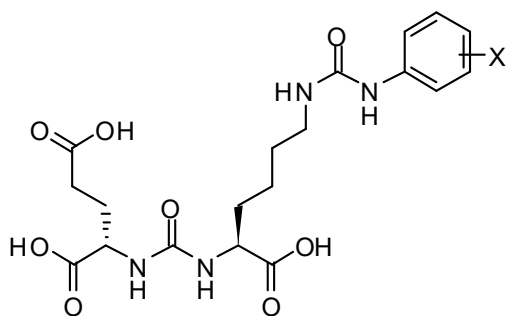


na qual

o hidrogênio dos grupos carbóxi do composto ou sal pode ser substituído com C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquila; e

X é selecionado dentre halogênio e H.

19. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que apresenta a seguinte estrutura:



na qual

o hidrogênio dos grupos carbóxi do composto ou sal pode ser substituído com C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquila; e

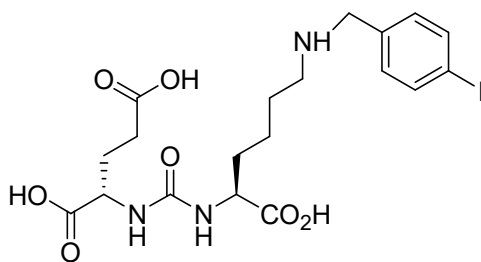
X é selecionado dentre halogênio e H.

20. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o halogênio é um radiohalogênio.

21. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que X é selecionado do grupo consistindo em: I, Br, Cl, F, I-123, I-125, I-131, I-124, Br-75, Br-77 e F-18, e H.

22. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que X é I-123, I-125, I-131 ou I-124.

23. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que apresenta a fórmula:

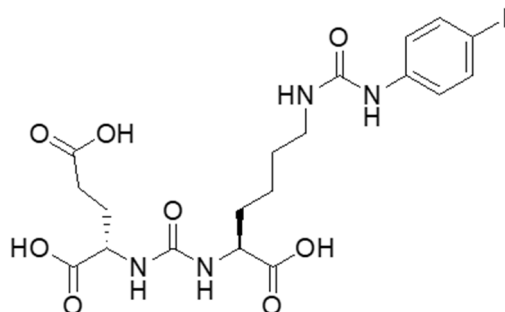


24. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o halogênio é um radiohalogênio.

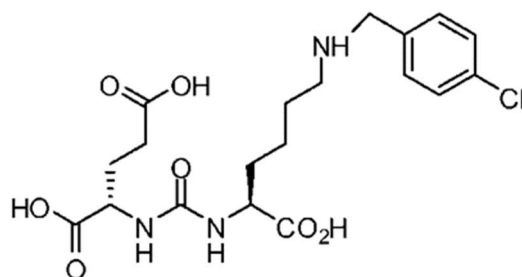
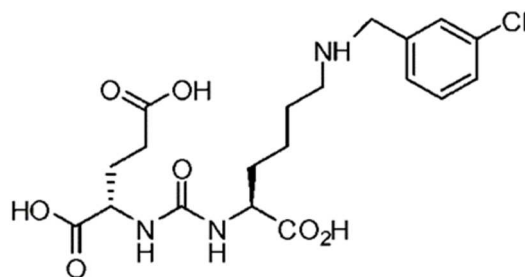
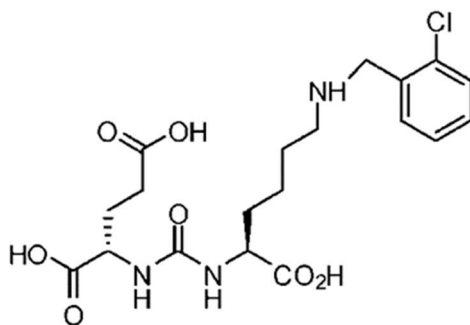
25. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que X é selecionado do grupo consistindo em: I, Br, Cl, F, I-123, I-125, I-131, I-124, Br-75, Br-77 e F-18, e H.

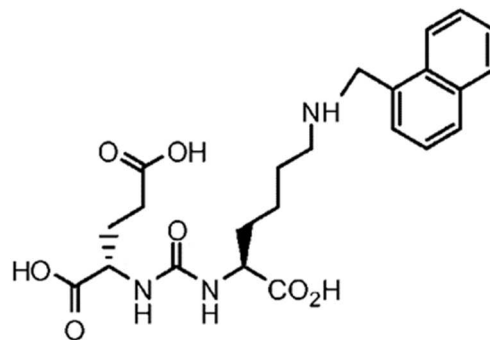
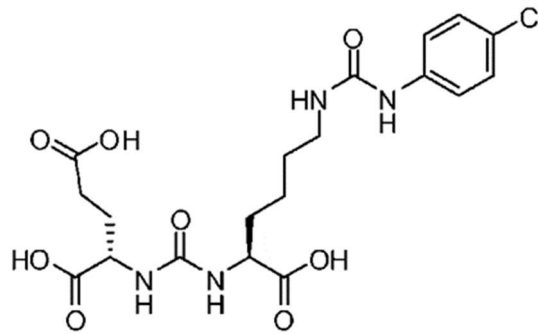
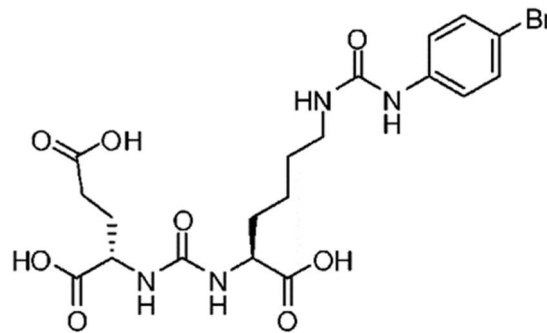
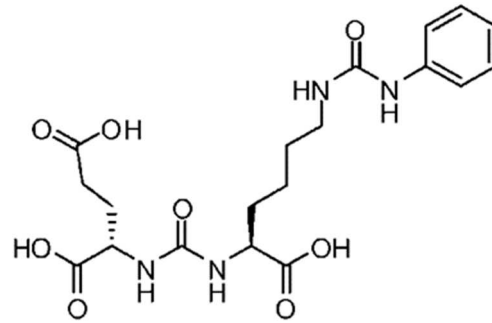
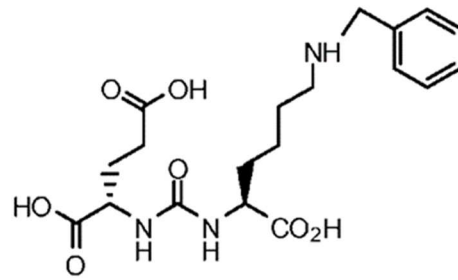
26. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que X é I-123, I-125, I-131 ou I-124.

27. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que apresenta a fórmula:



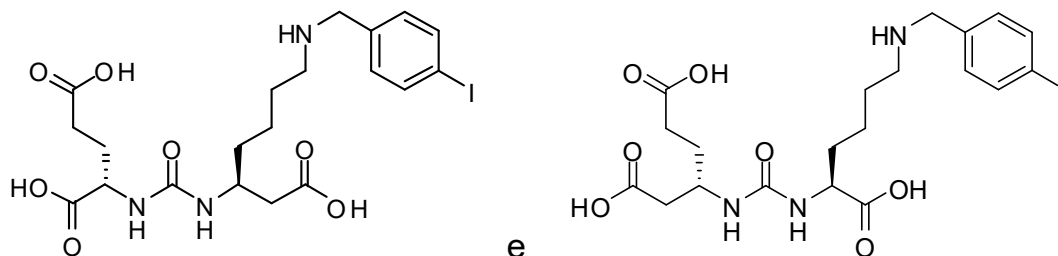
28. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é selecionado do grupo consistindo em:



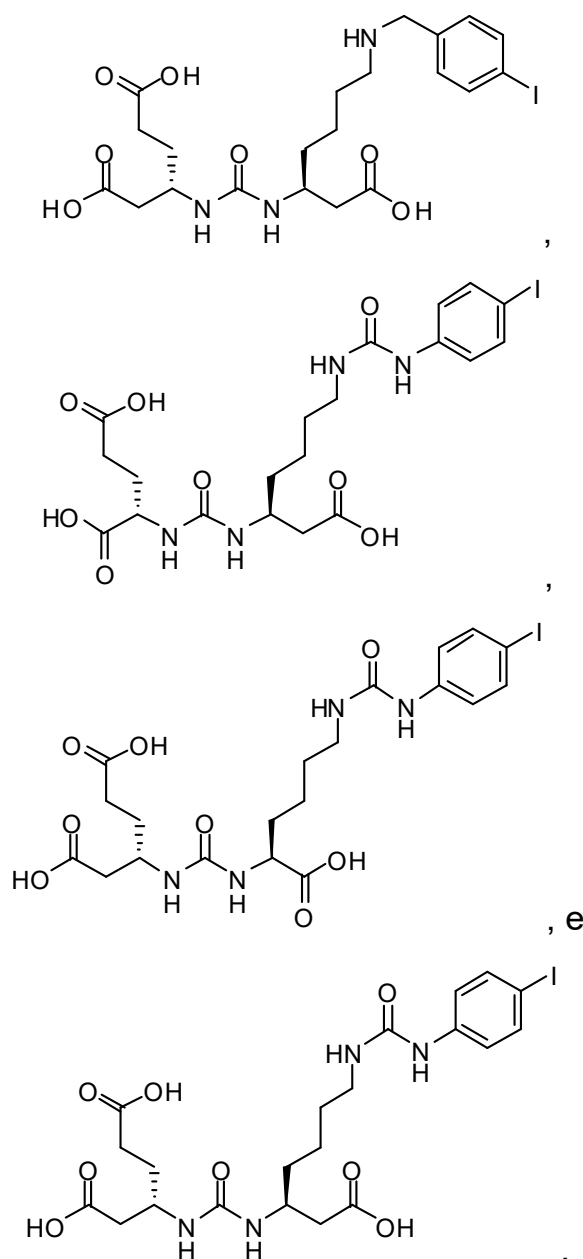


e

29. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é selecionado do grupo consistindo em:



30. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é selecionado do grupo que consiste em:

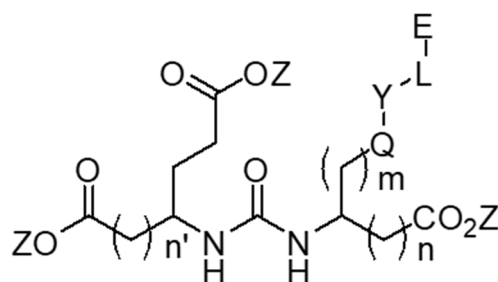


31. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que X é um radihalogênio de I, Br, Cl ou F.

32. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o radiohalogênio é um radiohalogênio de imageamento.

33. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o radiohalogênio é I-123, I-125, I-131, I-124, Br-75, Br-77 ou F-18.

34. Composto, caracterizado pelo fato de que apresenta a fórmula (III)



(Fórmula III)

na qual

L é uma ligação, uma C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub> alquila opcionalmente substituída, ou  $-\text{[(CH}_2\text{)}_q\text{O]}_s\text{--}$ , sendo que q e s são independentemente um número inteiro de 1 a 10;

E é  $-\text{NR}'\text{R}'$ ;

Q é NR';

Y é C(O);

Z é H ou C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquila;

m é 1, 2, 3, 4 ou 5;

n é 0;

n' is 0;e

R' é independentemente H, uma C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> arila substituída ou não-substituída, sendo que o termo arila se refere a um grupo aromático que apresenta um ou mais anéis tendo um sistema pi elétron conjugado

e inclui grupo arila carbocíclica, arila heterocíclica e biarila; uma C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> heteroarila substituída ou não-substituída, sendo que o termo heteroarila se refere a um grupo arila apresentando de 1 a 3 heteroátomos como átomos de anel, o restante dos átomos de anel sendo carbono; ou uma C<sub>1</sub>-C<sub>14</sub> alquila substituída ou não-substituída, sendo que alquila se refere a um hidrocarboneto de alifático saturado cadeia linear, ramificada ou cíclica;

quando substituídas, arila, heteroarila e alquila são substituídas com halogênio, C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> heteroarila, ou COOZ,

ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, sendo que o termo sal farmacologicamente aceitável se refere àqueles sais que retêm as propriedades e eficácia biológica das bases livres e são obtidos por reação com ácidos inorgânicos.

35. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que L é uma C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub> alquila opcionalmente substituída.

36. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que R' é independente H, uma C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> heteroarila substituída ou não-substituída, ou uma C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub> alquila substituída ou não-substituída.

37. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que R' é independente uma C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub> heteroarila substituída ou não-substituída, ou uma C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub> alquila substituída ou não-substituída, e, quando substituída, a C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub> alquila substituída é substituída com COOH.

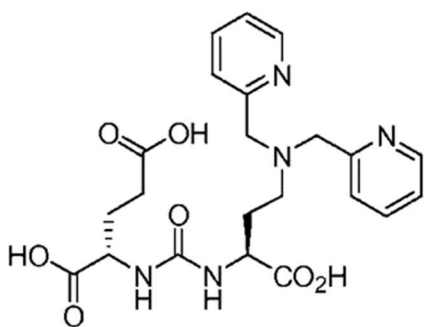
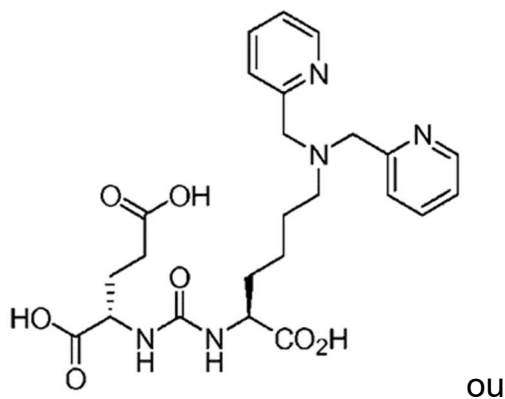
38. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que:

m é 1, 2, 3 ou 4;

R é -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>1-4</sub>CHNR'R"; e

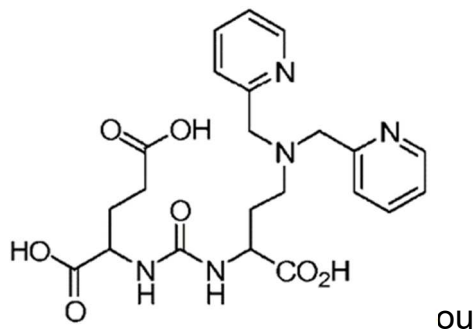
R' é independentemente uma C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> alquila substituída com um grupo piridina ou carbóxi.

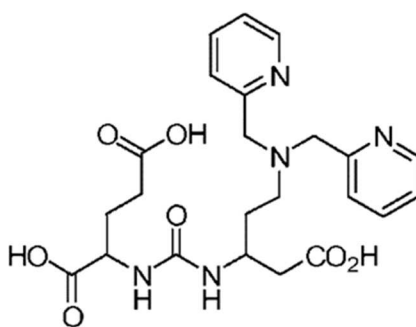
39. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que é:



sendo que o hidrogênio dos grupos carbóxi de quaisquer dos compostos acima podem ser substituído com C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquila.

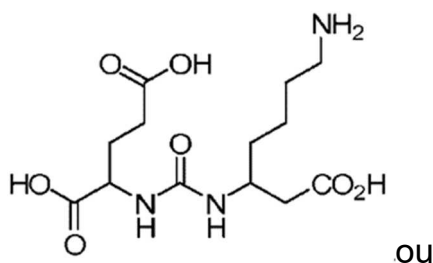
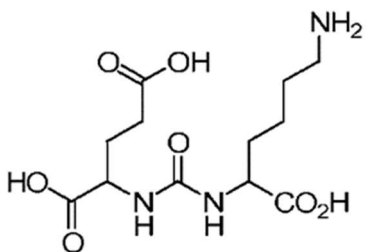
40. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que é:



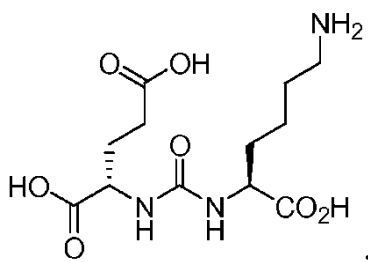


sendo que o hidrogênio dos grupos carbóxi de quaisquer dos compostos acima podem ser substituído com C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquila.

41. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é:

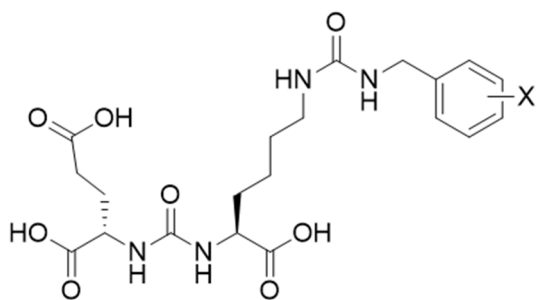


ou



sendo que o hidrogênio dos grupos carbóxi de quaisquer dos compostos acima podem ser substituído com C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquila.

42. Composto, caracterizado pelo fato de que apresenta a fórmula:



na qual

X é selecionado do grupo consistindo em: I, Br, Cl, F e H;  
ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

43. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que X é um radiohalogênio de I, Br, Cl ou F.

44. Composto, ou sal, de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que apresenta a fórmula:

