

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **034516**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.02.14**

(21) Номер заявки  
**201791167**

(22) Дата подачи заявки  
**2015.11.24**

(51) Int. Cl. **A61K 51/04** (2006.01)  
**A61K 51/08** (2006.01)  
**C07B 59/00** (2006.01)

---

(54) **СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ МЕЧЕНИЯ РАДИОАКТИВНЫМ ИЗОТОПОМ <sup>18</sup>F  
БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

---

(31) **62/084,366**

(32) **2014.11.25**

(33) **US**

(43) **2017.11.30**

(86) **PCT/US2015/062502**

(87) **WO 2016/086036 2016.06.02**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ  
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:  
**Доннелли Дэвид (US)**

(74) Представитель:  
**Угрюмов В.М. (RU)**

(56) B. Kuhnast ET AL.: "PEG-<sup>18</sup>F]FPyZIDE AND PEG-<sup>18</sup>F] FPyKYNE, TWO NEW FLUOROPYRIDINE-BASED REAGENTS FOR THE FLUORINE-18 LABELING OF MACROMOLECULES USING CLICK CHEMISTRY", *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 17 June 2009 (2009-06-17), page S184, XP055250504, Retrieved from the Internet: URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/jlcr.1640/asset/1640ftp.pdf?v=1&t=ikpgmdsg&s=e9ba4c2af16fa5105e6dcb8955514fcc1ee23567>, [retrieved on 2016-02-16], abstract

LACHLAN S. CAMPBELL-VERDUYN ET AL.: "Strain-Promoted Copper-Free "Click"

Chemistry for <sup>18</sup>F Radiolabeling of Bombesin", *ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION*, vol. 50, no. 47, 18 November 2011 (2011-11-18), pages 11117-11120, XP55250606, DE, ISSN: 1433-7851, DOI: 10.1002/anie.201105547, abstract, schemes 1-4

KALME SACHIN ET AL.: "F-18 Labeling Protocol of Peptides Based on Chemically Orthogonal Strain-Promoted Cycloaddition under Physiologically Friendly Reaction Conditions", *BIOCONJUGATE CHEMISTRY*, vol. 23, no. 8, 15 August 2012 (2012-08-15), pages 1680-1686, XP55043362, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/bc3002425, abstract, figures 3, 5

BERTRAND KUHNAST ET AL.: "[<sup>18</sup>F]FPyKYNE, a fluoropyridine-based alkyne reagent designed for the fluorine-18 labelling of macromolecules using click chemistry", *JOURNAL OF LABELLED COMPOUNDS AND RADIOPHARMACEUTICALS*, vol. 51, no. 9, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 336-342, XP55250465, CHICHESTER; GB, ISSN: 0362-4803, DOI: 10.1002/jlcr.1533, abstract

ANA C. VALDIVIA ET AL.: "A fast, simple, and reproducible automated synthesis of [<sup>18</sup>F]FPyKYNE-c(RGDyK) for [ $\alpha$ ]<sub>v</sub>[ $\beta$ ]<sub>3</sub> receptor positron emission tomography imaging", *JOURNAL OF LABELLED COMPOUNDS AND RADIOPHARMACEUTICALS*, vol. 55, no. 2, 16 November 2011 (2011-11-16), pages 57-60, XP55250449, CHICHESTER; GB, ISSN: 0362-4803, DOI: 10.1002/jlcr.1948, abstract

(57) Изобретение относится к водорастворимым <sup>18</sup>F-простетическим группам и раскрывает синтез и применение <sup>18</sup>F-меченых биологических молекул, содержащих <sup>18</sup>F-простетические группы, для визуализации различных процессов, протекающих в организме, детекции локализации молекул, ассоциированных с патологией заболевания, и мониторинга прогрессирования заболевания.

**B1****034516****034516****B1**

### Ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США номер 62/084366, озаглавленной "Способы и композиции для мечения радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  биологических препаратов", поданной 25 ноября 2014 года, содержание которой включено в настоящую заявку посредством отсылки.

### Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к  $^{18}\text{F}$ -простетическим группам, а также синтезу и применению  $^{18}\text{F}$ -меченых композиций для визуализации различных процессов, протекающих в организме, детекции локализации молекул, ассоциированных с патологией заболевания, и мониторинга прогрессирования заболевания.

### Предпосылки создания изобретения

Позитронно-эмиссионная томография (PET) является неинвазивным методом визуализации, который стал одним из наиболее широко применяемых способов в диагностической медицине и разработке лекарственных средств, отличающимся высокой чувствительностью (фмоль), высоким разрешением (4-10 мм) и накоплением в ткани, которое может быть оценено количественно. Ценная *in vivo* функциональная информация о биологических процессах, протекающих в живых организмах, полученная с помощью PET-визуализации, обеспечивает также уникальное преимущество для трансляционной медицины, состоящее в том, что один инструмент может быть использован доклинически и клинически.

Позитронно-эмиссионная томография (PET) основана на дизайне и синтезе молекул, меченых позитрон-излучающими радиоизотопами, включая  $^{18}\text{F}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{94}\text{mTc}$ ,  $^{86}\text{Y}$  и  $^{124}\text{I}$ . Эти радиотрейсеры или радиолиганды *in vivo* излучают позитроны из ядра изотопа с различными энергиями в зависимости от используемого изотопа. Энергия испускаемого позитрона обуславливает среднее расстояние, которое он проходит перед столкновением с электроном, что вызывает эмиссию двух гамма-лучей с энергией 511 кэВ, направленных противоположно друг по отношению к другу. Гамма-лучи, образовавшиеся вследствие этого события позитронной аннигиляции, детектируются с помощью сканера PET-визуализации с получением планарных и томографических изображений, которые выявляют распределение радиотрейсера как функцию времени. Таким образом, изотопы, которые представляют собой чистые излучатели позитронов и обладают низкой энергией излучения, являются предпочтительными для PET-визуализации для сведения к минимуму расстояния, которое проходит позитрон до аннигиляции, и проблем в дозиметрии, вызванных другими излучениями, такими как гамма-лучи, альфа-частицы или бета-частицы.

Кроме того, период полураспада изотопа, используемого в PET-визуализации, должен быть достаточно длинным для того, чтобы обеспечить возможность синтеза и анализа молекулы радиотрейсера, инъектирования пациенту, *in vivo* локализации, клиренса из нецелевых тканей и получения четкого изображения. Изотоп  $^{18}\text{F}$  ( $\beta^+$  635 кэВ 97%,  $t_{1/2}$  110 мин) является одним из наиболее широко применяемых для PET излучающих изотопов благодаря своей низкой энергии излучения позитронов, отсутствию побочных излучений и подходящему периоду полураспада.

Традиционно, мечение  $^{18}\text{F}$  биологических молекул, таких как пептиды и белки, было затруднительным из-за жестких условий (высоких температур, органических растворителей и сильных основных условий), требуемых для мечения этим радиоизотопом. Одним из подходов к мечению белков  $^{18}\text{F}$  является использование простетической группы, способной выдерживать жесткие условия фторирования. Описано множество простетических групп (например, рассмотренных в Nucl. Med. Bio. 34:5, 2007), но многие из этих  $^{18}\text{F}$ -меченых простетических групп требуют присутствия органических растворителей и являются непригодными для мечения белка или белковоподобных молекул в водной среде, или обладают другими нежелательными свойствами.

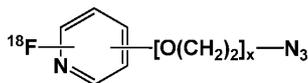
Таким образом, до сих пор сохраняется потребность в быстрых, простых способах  $^{18}\text{F}$ -мечения нацеливающих фрагментов, таких как белки и пептиды, для получения композиций радиотрейсеров, которые сохраняют достаточную специфическую активность и стабильность для применения в *in vivo* методологиях визуализации.

### Краткое описание изобретения

Изобретение основано, по меньшей мере частично, на открытии того, что  $^{18}\text{F}$ -меченая простетическая группа, которая содержит нитропиридин, связанный с полиэтиленгликолевым (PEG) фрагментом и концевым азидом, является водорастворимой и менее летучей по сравнению с другими агентами, используемыми для  $^{18}\text{F}$ -мечения, и что реакции включения этой  $^{18}\text{F}$ -меченой простетической группы в биологические молекулы (например, пептиды и белки) можно наблюдать с помощью УФ-излучения. Эти полезные особенности обеспечивают эффективный, быстрый и воспроизводимый способ получения  $^{18}\text{F}$ -меченых биомолекул в условиях, в которых сохраняется биологическая активность биомолекулы. В определенных вариантах осуществления биомолекулы (например, пептиды и белки), содержащие бифункциональные конъюгирующие фрагменты (например, с алкиновыми группами конформационно ограниченного кольца, такими как бифункциональные хелаторы), образуют ковалентные связи с концевым азидом  $^{18}\text{F}$ -меченой простетической группы посредством биортогональной "клик"-реакции с получением радиоактивно меченых зондов, которые являются стабильными в физиологических условиях. Поглощение УФ-излучения конечного продукта дополнительно обеспечивает практический, чувствительный и

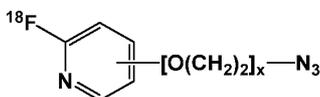
быстрый аналитический способ определения радиохимической чистоты продукта.

В одном аспекте в настоящем документе предлагается  $^{18}\text{F}$ -меченая простетическая группа, имеющая следующую структуру



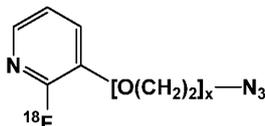
или ее фармацевтически приемлемая соль, где  $x$  представляет собой целое число от 1 до 8. В некоторых вариантах осуществления  $x$  представляет собой целое число от 2 до 6. В некоторых вариантах осуществления  $x$  представляет собой целое число от 3 до 5. В некоторых вариантах осуществления  $x$  равно 4. В некоторых вариантах осуществления фрагмент  $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$  присутствует в 1-2, 1-3 или 1-4 конфигурации относительно азота на пиридиновом кольце. В родственных вариантах осуществления  $^{18}\text{F}$  присоединен к пиридину в орто-положении относительно атома N. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль выбрана из группы, состоящей из фтористых, бромистых, хлористых и йодистых солей. В одном варианте осуществления соль представляет собой трифторметансульфонатную соль. В некоторых вариантах осуществления меченая радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  простетическая группа или фармацевтически приемлемая соль является растворимой в воде. В некоторых вариантах осуществления меченая радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  простетическая группа или фармацевтически приемлемая соль является нелетучей.

В некоторых вариантах осуществления предлагается меченое радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  соединение, имеющее структуру



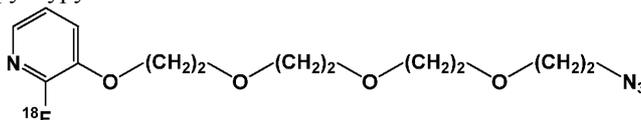
или его фармацевтически приемлемая соль, где  $x$  представляет собой целое число от 1 до 8. В некоторых вариантах осуществления  $x$  представляет собой целое число от 2 до 6. В некоторых вариантах осуществления  $x$  представляет собой целое число от 3 до 5. В некоторых вариантах осуществления  $x$  равно 4. В некоторых вариантах осуществления фрагмент  $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$  присутствует в 1-2, 1-3 или 1-4 конфигурации относительно азота на пиридиновом кольце. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль выбрана из группы, состоящей из фтористых, бромистых, хлористых и йодистых солей. В одном варианте осуществления соль представляет собой трифторметансульфонатную соль. В некоторых вариантах осуществления меченая радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  простетическая группа или фармацевтически приемлемая соль является нелетучей.

В некоторых вариантах осуществления предлагается меченое радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  соединение, имеющее структуру



или его фармацевтически приемлемая соль, где  $x$  представляет собой целое число от 1 до 8. В некоторых вариантах осуществления  $x$  представляет собой целое число от 2 до 6. В некоторых вариантах осуществления  $x$  представляет собой целое число от 3 до 5. В некоторых вариантах осуществления  $x$  равно 4. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль выбрана из группы, состоящей из фтористых, бромистых, хлористых и йодистых солей. В одном варианте осуществления соль представляет собой трифторметансульфонатную соль. В некоторых вариантах осуществления меченая радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  простетическая группа или фармацевтически приемлемая соль является нелетучей.

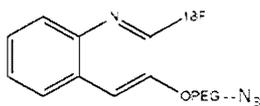
В некоторых вариантах осуществления предлагается меченое радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  соединение, которое имеет структуру



или его фармацевтически приемлемая соль.

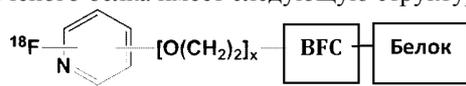
В определенных вариантах осуществления пиридиновое кольцо  $^{18}\text{F}$ -меченой простетической группы содержит один или несколько дополнительных заместителей, которые не препятствуют фторированию молекулы. В некоторых вариантах осуществления дополнительный заместитель представляет собой  $\text{C}_{1-6}$ -алкил, например метил, этил или пропил.

В родственном аспекте в настоящем документе предлагается меченая радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  простетическая группа, имеющая структуру



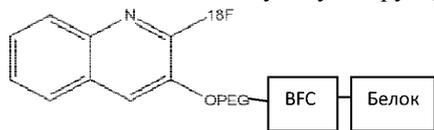
где "OPEG" представляет собой  $[O(CH_2)_2]_x$  и  $x$  представляет собой целое число от 1 до 8, или ее фармацевтически приемлемая соль. В некоторых вариантах осуществления  $x$  представляет собой целое число от 2 до 6. В некоторых вариантах осуществления  $x$  представляет собой целое число от 3 до 5. В некоторых вариантах осуществления  $x$  равно 4. В некоторых вариантах осуществления меченая радиоактивным изотопом  $^{18}F$  простетическая группа или фармацевтически приемлемая соль является нелетучей.

В определенных аспектах в настоящем документе предлагается зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}F$  белка, содержащий меченую радиоактивным изотопом  $^{18}F$  простетическую группу, описанную здесь, бифункциональный хелатор или конъюгирующий (BFC) фрагмент и белок, при этом зонд на основе радиоактивно меченого белка имеет следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль.

В определенных аспектах в настоящем документе предлагается зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}F$  белка, содержащий меченую радиоактивным изотопом  $^{18}F$  простетическую группу, описанную здесь, бифункциональный хелатор или конъюгирующий (BFC) фрагмент и белок, при этом зонд на основе радиоактивно меченого белка имеет следующую структуру:



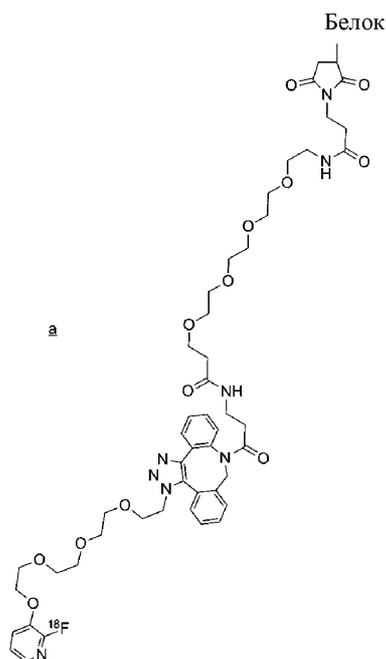
или его фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления BFC представляет собой циклооктин, содержащий реакционноспособную группу, которая образует ковалентную связь с аминовой, карбоксильной, карбонильной или тиольной функциональной группой на белке. В некоторых вариантах осуществления циклооктин выбран из группы, состоящей из дибензоциклооктина (DIBO), биарилазациклооктинона (BARAC), диметоксиазациклооктина (DIMAC) и дибензоциклооктина (DBCO). В некоторых вариантах осуществления циклооктин представляет собой DBCO.

В некоторых вариантах осуществления BFC дополнительно содержит в качестве спейсерной группы полиэтиленгликоль (PEG)<sub>y</sub>, где  $y$  представляет собой целое число от 1 до 8. В некоторых вариантах осуществления  $y$  представляет собой целое число от 2 до 6. В некоторых вариантах осуществления  $y$  равно 4 или 5.

В некоторых вариантах осуществления BFC представляет собой DBCO-PEG4-NHS-сложный эфир, DBCO-сульфо-NHS-сложный эфир, DBCO-PEG4-кислота, DBCO-PEG4-амин или DBCO-PEG4-малеимид. В некоторых вариантах осуществления BFC представляет собой DBCO-PEG4-малеимид.

В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагается зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}F$  белка, имеющий следующую структуру:



где maleимидная группа ВФС ковалентно связана с тиольной группой на цистеиновом остатке белка. В некоторых вариантах осуществления цистеиновый остаток расположен на С-конце белка.

В родственных вариантах осуществления белковая часть зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка содержит лиганд. В некоторых вариантах осуществления белковая часть зонда содержит антитело или фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления белковая часть зонда содержит каркас на основе фибронектина (FBS).

В родственных вариантах осуществления белковая часть зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка связывается с биологической молекулой, ассоциированной с заболеванием. В некоторых вариантах осуществления заболевание выбрано из группы, состоящей из солидного рака, гематопетического рака, гематологического рака, аутоиммунного заболевания, нейродегенеративного заболевания, сердечно-сосудистого заболевания и патогенных инфекций. В определенных вариантах осуществления зонд связывается с опухоль-ассоциированным антигеном. В определенных вариантах осуществления зонд связывается с белком, присутствующим на патогенном организме, например, вирусе, бактерии или грибе.

В определенных вариантах осуществления описанный здесь зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка может быть представлен в виде фармацевтической композиции.

В родственном аспекте в настоящем документе предлагается способ получения изображения зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка, описанного здесь, при этом способ включает следующие стадии: (а) введение зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка субъекту; и (b) визуализацию *in vivo* распределения зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка путем сканирования методом позитронно-эмиссионной томографии (PET). В некоторых вариантах осуществления полученное изображение распределения зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка свидетельствует о присутствии или отсутствии заболевания.

В родственном аспекте в настоящем документе предлагается способ диагностики присутствия заболевания у субъекта, при этом способ включает следующие стадии: (а) введение субъекту, нуждающемуся в этом, зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка, описанного здесь, который связывается с молекулой-мишенью, ассоциированной с присутствием заболевания; и (b) получение радиоизображения по меньшей мере части субъекта для детекции присутствия или отсутствия зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка; при этом присутствие и локализация зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка выше исходного уровня указывает на присутствие и локализацию заболевания.

В родственном аспекте в настоящем документе предлагается способ мониторинга прогрессирования заболевания у субъекта, при этом способ включает следующие стадии: (а) введение субъекту, нуждающемуся в этом, зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка, описанного здесь, который связывается с молекулой-мишенью, ассоциированной с присутствием заболевания, в первый момент времени, и получение изображения по меньшей мере части субъекта для определения количества пораженных заболеванием клеток или ткани; и (b) введение субъекту зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка в один или несколько последовательных моментов времени и получение изображения по меньшей мере части субъекта в каждый момент времени; при этом размер и локализация пораженных заболеванием клеток или ткани в каждый момент времени указывает на прогрессирование

заболевания.

В родственном аспекте в настоящем документе предлагается способ количественной оценки пораженных заболеванием клеток или тканей у субъекта, при этом способ включает следующие стадии: (а) введение субъекту, имеющему пораженные заболеванием клетки или ткани, зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка, описанного здесь, который связывается с молекулой-мишенью, локализованной в пораженных заболеванием клетках или тканях; и (б) детекцию радиоактивного излучения  $^{18}\text{F}$  в пораженных заболеванием клетках или тканях, при этом уровень и распределение радиоактивного излучения в пораженных заболеванием клетках или тканях является количественным показателем пораженных заболеванием клеток или тканей.

В родственном аспекте в настоящем документе предлагается способ скрининга агента для лечения заболевания, включающий следующие стадии: (а) приведение в контакт клеток, экспрессирующих белок-мишень, ассоциированный с заболеванием, с зондом на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка, описанного здесь, который связывается с белком-мишенью в присутствии и отсутствии агента-кандидата; и (б) визуализацию клеток в присутствии и отсутствии агента-кандидата с использованием позитронно-эмиссионной томографии (PET), при этом уменьшение количества радиоактивного излучения в присутствии агента-кандидата указывает на то, что агент связывается с белком-мишенью.

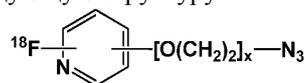
В некоторых вариантах осуществления этих способов заболевание выбрано из группы, состоящей из солидного рака, гематопоэтического рака, гематологического рака, аутоиммунного заболевания, нейродегенеративного заболевания, сердечно-сосудистого заболевания и патогенной инфекции (например, вирусных, бактериальных или грибковых инфекций).

В родственном аспекте в настоящем документе предлагается способ получения количественного изображения тканей или клеток, экспрессирующих белок-мишень, при этом способ включает стадии приведения в контакт клеток или тканей с зондом на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка, описанным здесь, который связывается с белком-мишенью, и детекции или количественной оценки ткани, экспрессирующей белок-мишень, с использованием позитронно-эмиссионной томографии (PET).

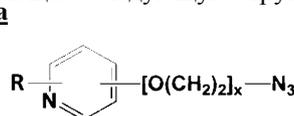
В некоторых вариантах осуществления способов, представленных здесь, зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка содержит лиганд. В некоторых вариантах осуществления зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка содержит антитело или фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка содержит каркас на основе фибронектина (FBS). В некоторых вариантах осуществления зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка связывается с опухоль-ассоциированным антигеном. В еще других вариантах осуществления зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка связывается с белком, присутствующим на патогенном организме (например, вирусе, бактерии или грибе).

Также, в настоящем документе предлагаются наборы, содержащие прекурсоры реакции, для получения зондов на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка, описанных здесь (например, немеченую радиоактивным изотопом простетическую группу, BFC-связанный белковый зонд и реагенты для осуществления биоортогональной клик-реакции), и инструкции по получению зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка.

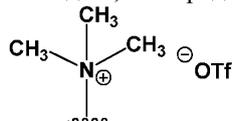
Таким образом, в одном аспекте в настоящем документе предлагается способ получения F-меченой простетической группы, имеющей следующую структуру:



где  $x$  представляет собой целое число от 1 до 8, при этом способ включает следующие стадии: (а) обеспечение раствора соединения a, имеющего следующую структуру:

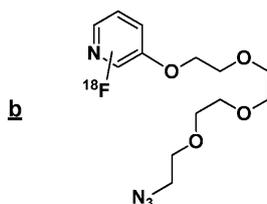


где  $x$  представляет собой целое число от 1 до 8, и R представляет собой  $\text{NO}_2$ , Br, F или

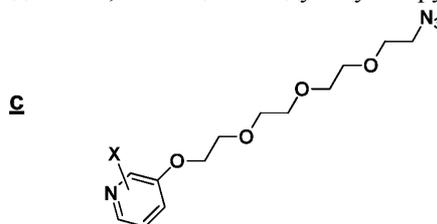


и находится в орто-положении относительно атома N пиридинового кольца; (б) обеспечение смеси  $^{18}\text{F}$  в  $^{18}\text{O}$ -воде, 4,7,13,16,21,24-гексаокса-1,10-дизабицикло[8.8.8]гексакозана и слабого основания; (с) сушку смеси, полученной на стадии (б), с получением твердого вещества; и (д) взаимодействие раствора, полученного на стадии (а), с твердым веществом, полученным на стадии (с), с образованием  $^{18}\text{F}$ -меченого соединения.

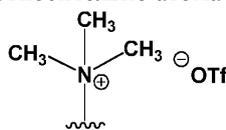
В определенных вариантах осуществления способ обеспечивает получение  $^{18}\text{F}$ -пиридиновой простетической группы, имеющей следующую структуру b:



(где  $^{18}\text{F}$  находится в орто-положении относительно атома N), и включает следующие стадии:  
 (а) обеспечение раствора соединения, имеющего следующую структуру:



(где X находится в орто-положении относительно атома N), где X представляет собой  $\text{NO}_2$ , Br или



(b) обеспечение смеси  $^{18}\text{F}$  в  $^{18}\text{O}$ -воде, 4,7,13,16,21,24-гексаокса-1,10-диазабицикло[8.8.8]гексакозана и слабого основания; (с) сушку смеси, полученной на стадии (b), с образованием твердого вещества; и (d) взаимодействие раствора, полученного на стадии (а), с твердым веществом, полученным на стадии (с), с образованием  $^{18}\text{F}$ -меченого соединения.

В определенных вариантах осуществления исходное соединение X на описанной выше стадии а) представляет собой  $\text{NO}_2$ . В определенных вариантах осуществления исходное соединение X присоединено к атому углерода в орто-положении относительно атома N и боковой цепи PEG- $\text{N}_3$ . В определенных вариантах осуществления слабое основание на стадии b) представляет собой  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , карбонат цезия или тетрабутиламмония гидроксид. В одном варианте осуществления слабое основание на стадии b) представляет собой  $\text{K}_2\text{CO}_3$ .

В родственном аспекте предлагается способ  $^{18}\text{F}$ -мечения белка, который включает стадию связывания меченой радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  простетической группы формулы b с подлежащим радиоактивному мечению белком в "клик-реакции" с образованием меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка. В некоторых вариантах осуществления биоортогональная клик-реакция не катализируется металлом (например, не катализируемая медью клик-реакция). В некоторых вариантах осуществления белок содержит бифункциональный конъюгирующий (BFC) фрагмент (например, бифункциональный хелатор). В некоторых вариантах осуществления белок содержит BFC, которым является циклоктин. В некоторых вариантах осуществления белок содержит DBCO-PEG4-малеимид или ковалентно с ним связан.

Другие отличительные признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и примеров, которые не должны рассматриваться как ограничивающие.

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана схема химического синтеза [ $^{18}\text{F}$ ]-E01-4PEG-DBCO-FPPEGA. E01-часть молекулы имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1;

на фиг. 2 - столбчатая диаграмма, отражающая распределение в ткани радиотрейсера  $^{18}\text{F}$ -A02 у мышей, несущих билатеральные ксенотрансплантаты PD-L1(+) L2987 и PD-L1(-) HT-29, по данным измерений *ex vivo* с помощью гамма-счетчика;

на фиг. 3 - сборное изображение распределения  $^{18}\text{F}$ -E01 у макак-крабоедов;

на фиг. 4A и B - изображения радиоавтографии *in vitro*  $^{18}\text{F}$ -A02 в ксенотрансплантате и человеческих тканях легкого;

на фиг. 5 - схема получения меченого радиоактивным изотопом [ $^{18}\text{F}$ ] A02-PEG-DBCO-FPPEGA с использованием не катализируемой металлом "клик-химии";

на фиг. 6 - схема модуля синтеза GE TRACERlab FX2 N для автоматизированного синтеза [ $^{18}\text{F}$ ]-FPPEGA;

на фиг. 7 - схема модуля синтеза Synthra (IBA) для автоматизированного синтеза [ $^{18}\text{F}$ ]-FPPEGA.

#### Подробное описание

В документе описаны  $^{18}\text{F}$ -простетические группы и способы получения  $^{18}\text{F}$ -простетических групп. Также, в настоящем документе описаны меченые радиоактивным изотопом композиции, содержащие  $^{18}\text{F}$ -простетические группы, и применение этих меченых радиоактивным изотопом композиций для диагностики, локализации, мониторинга и/или оценки пораженных заболеванием клеток и/или тканей, и соответствующих биологических состояний.

Определения.

Для лучшего понимания настоящего изобретения сначала представлены определения некоторых терминов. Дополнительные определения приведены в подробном описании изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют такие же значения, как они обычно понимаются специалистом в данной области, и используются общепринятые способы масс-спектрологии, ядерного магнитного резонанса (NMR), высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), химии белка, биохимии, технологии рекомбинантных ДНК и фармакологии.

Использование "или" и "и" означает "и/или", если не указано иное. Кроме того, использование термина "включающий", а также других форм, таких как "включать", "включает" и "включенный", не является ограничивающим.

Используемый здесь термин "около" означает в пределах плюс или минус десяти процентов от числового значения. Например, "около 100" будет относиться к числу между 90 и 110.

Используемое здесь выражение "медицинская визуализация" относится к методам и процессам, используемым для создания визуальных представлений внутренних структур тела субъекта (или его частей) в клинических целях (медицинские процедуры, направленные на выявление, диагностику или мониторинг заболевания) или в научных медицинских целях (включая исследование нормальной анатомии и физиологии).

Используемая здесь "позитронно-эмиссионная томография" или "PET" относится к неинвазивному методу медицинской радиологии, с помощью которого получают трехмерное изображение локализации трейсера в организме. Способ обеспечивает детекцию пар гамма-лучей, испускаемых опосредованно позитрон-излучающим радионуклидом (трейсером), который вводят в организм на биологически активной молекуле. Инструменты для PET-визуализации имеют широкое применение и содействуют разработке лекарственных средств как доклинически, так и клинически. Иллюстративные применения включают прямую визуализацию *in vivo* насыщения мишеней; мониторинг поглощения в нормальных тканях до предполагаемой токсичности или отклонения между пациентами; количественную оценку пораженной заболеванием ткани; метастазирование опухолей; и мониторинг эффективности лекарственного средства во времени или резистентности во времени.

Термин "биоортогональная химия" относится к любой химической реакции, которая может протекать внутри живых систем без нарушения нативных биохимических процессов. Термин включает химические реакции, которые представляют собой химические реакции, протекающие *in vitro* при физиологическом значении pH или в присутствии воды. Для того чтобы реакции считались биоортогональными, они должны быть селективными и избегать побочных реакций с другими функциональными группами, содержащимися в исходных соединениях. Кроме того, образовавшаяся ковалентная связь между партнерами реакции должна быть прочной и химически инертной в отношении биологических реакций и не должна нарушать биологическую активность желаемой молекулы.

Термин "клик-химия" относится к набору надежных и селективных биоортогональных реакций для быстрого синтеза новых соединений и комбинаторных библиотек. Свойства клик-реакций включают модульность, возможность масштабирования, высокий выход, стереоспецифичность и простоту выделения продукта (отделение от инертных побочных продуктов нехроматографическими способами) с получением соединений, которые являются стабильными в физиологических условиях. В радиохимии и радиофармакологии клик-химия является общим термином для набора реакций меченая, которые используют преимущества селективных и модульных строительных блоков, и способствуют хемоселективным лигированиям с радиоактивно мечеными биологически релевантными соединениями в отсутствие катализаторов. "Клик-реакция" может катализироваться медью или представлять собой не катализируемую медью клик-реакцию.

Термин "простетическая группа" или "бифункциональный агент для меченая" относится к малой органической молекуле, содержащей радионуклид (например,  $^{18}\text{F}$ ), которая способна связываться с пептидами или белками.

Термин "лиганд хелатора", используемый здесь в отношении радиофармацевтической химии, относится к бифункциональному хелатору или бифункциональному конъюгирующему (BFC) фрагменту (используются здесь взаимозаменяемо), который ковалентно связывает меченую радиоактивным изотопом простетическую группу с биологически активной нацеливающей молекулой (например, пептидом или белком). Бифункциональные конъюгирующие (BFC) фрагменты несут функциональные группы, такие как карбоновые кислоты или активированные сложные эфиры для реакций амидного сочетания, изотиоцианаты для реакций сочетания с тиомочевинной и малеимидами для реакций сочетания с тиолом.

Используемый здесь термин "мишень" в качестве общей ссылки на "биологическую мишень" относится к клетке, ткани (например, раковой или опухолевой), патогенному микроорганизму (например, бактерии, вирусу, грибу, растению, приону, простейшим или их части) или другой молекуле, связанной с биологическим путем или биологическим явлением, таким как воспаление ткани, образование бляшек и т.д.

Термины "нацеливающий лиганд", "нацеливающий агент" или "нацеливающая молекула" используются взаимозаменяемо в отношении молекулы, такой как пептид, белок, гликопротеин и т.д., которая связывается с другой молекулой. В определенных вариантах осуществления нацеливающий агент связы-

вается с  $^{18}\text{F}$ -протетической группой для "нацеливания" на молекулу, ассоциированную с конкретной клеткой, тканью, патогеном или биологическим путем.

Используемый здесь "полипептид" относится к любой последовательности из двух или более аминокислот, независимо от длины, посттрансляционной модификации или функции. "Полипептид", "пептид" и "белок" в настоящем документе используются взаимозаменяемо. Полипептиды могут включать природные аминокислоты и неприродные аминокислоты, такие как описанные в патенте США 6559126, включенном здесь путем ссылки. Полипептиды могут быть также модифицированы любым из стандартных химических способов (например, аминокислота может быть модифицирована с помощью защитной группы; карбокси-концевая аминокислота может быть преобразована в концевую амидную группу; амино-концевой остаток может быть модифицирован с помощью групп, например, для повышения липофильности; или полипептид может быть химически гликозилирован или иным образом модифицирован для повышения стабильности или периода полувыведения *in vivo*). Модификации полипептида могут включать присоединение другой структуры, такой как циклическое соединение или другая молекула, к полипептиду и могут также включать полипептиды, которые содержат одну или несколько аминокислот в измененной конфигурации (т.е. R или S; или L или D).

"Выделенный" полипептид представляет собой полипептид, который был идентифицирован и отделен от, и/или выделен из компонентов природного окружения. Контаминирующие компоненты природного окружения представляют собой материалы, которые будут препятствовать диагностическому или терапевтическому использованию полипептида, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления полипептид очищают: (1) на более чем 95 мас.% полипептида, как определено по методу Лоури, и наиболее предпочтительно на более чем 99 мас.%, (2) до степени, достаточной для того, чтобы получить, по меньшей мере, остатки на N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности при использовании секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности, по данным оценки SDS-PAGE в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях, с использованием красителя кумасси-голубого или, предпочтительно, серебряного красителя. Выделенный полипептид включает полипептид *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент природного окружения полипептида не присутствует. Однако обычно выделенный полипептид получают, по меньшей мере, в ходе одной стадии очистки.

Термины "специфически связывается", "специфическое связывание", "селективное связывание" и "селективно связывается", используемые здесь взаимозаменяемо, относятся к пептиду или полипептиду, который проявляет аффинность в отношении биологической мишени, но значительно не связывается (например, связывание менее чем около 10%) с другими молекулами по данным измерений существующими в данной области способами, таким как, но без ограничения, анализ Скэтчарда и/или анализы конкурентного связывания (например, конкурентный анализ ELISA, BIACORE).

Используемый здесь термин "преимущественно связывается" относится к ситуации, в которой пептид или белок связывается с выбранной биологической мишенью по меньшей мере на около 20% больше, чем он связывается с другой биологической мишенью, по данным измерений способом, существующим в данной области, таким как, но без ограничения, анализ Скэтчарда и/или анализы конкурентного связывания (например, конкурентный анализ ELISA, BIACORE).

Используемый здесь термин " $K_D$ " относится к равновесной константе диссоциации белок-белкового взаимодействия (например, зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка - молекула-мишень) или аффинности зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка в отношении белка-мишени по данным измерений с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса или анализа клеточного связывания. Используемое здесь выражение "желательное значение  $K_D$ " относится к значению  $K_D$  зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка, которое является достаточным для предполагаемых целей. Например, желательное значение  $K_D$  может относиться к значению  $K_D$  зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка, которое требуется для вызывания функционального эффекта в анализе визуализации *in vivo* или анализе *in vitro*, например клеточном анализе люциферазы.

Термин " $k_{\text{асс}}$ ", используемый здесь, относится к константе скорости ассоциации для ассоциации зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка в комплексе зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка/белок-мишень.

Термин " $k_{\text{дисс}}$ ", используемый здесь, относится к константе скорости диссоциации для диссоциации зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка из комплекса зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка/белок-мишень.

Термин " $\text{IC}_{50}$ ", используемый здесь, относится к концентрации зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка, которая ингибирует ответ в анализе *in vitro* или *in vivo* до уровня, который составляет 50% от максимального ингибирующего ответа, т.е. находится посередине между максимальным ингибирующим ответом и ответом при отсутствии лечения.

Термин "РК" является аббревиатурой термина "фармакокинетика" и охватывает свойства соединения, включая, в качестве примера, абсорбцию, распределение, метаболизм и выведение субъектом. Ис-

пользуемое здесь выражение "модулирующий РК белок" или "(модулирующий) РК фрагмент" относится к любому белку, пептиду или фрагменту, который при слиянии или совместном введении с биологически активной молекулой влияет на ее фармакокинетические свойства. Примеры модулирующего РК белка или (модулирующего) РК фрагмента включают PEG, вещества, связывающие человеческий сывороточный альбумин (HSA) (описанные в публикациях США 2005/0287153 и 2007/0003549, PCT публикациях WO 2009/083804 и WO 2009/133208), человеческий сывороточный альбумин и его варианты, трансферрин и его варианты, Fc или Fc-фрагменты и их варианты, и сахара (например, сиаловая кислота).

"Период полувыведения из сыворотки крови" белка или соединения может быть в целом определен как время, необходимое для уменьшения концентрации полипептида в сыворотке крови *in vivo* на 50%, например, вследствие деградации последовательности или соединения и/или клиренса или секвестрирования последовательности или соединения посредством природных механизмов. Период полувыведения может быть определен *per se* любым известным способом, таким как фармакокинетический анализ. Подходящие способы будут очевидны для специалиста в данной области и обычно включают, например, следующие стадии: введение подходящим способом субъекту подходящей дозы аминокислотной последовательности или соединения, описанного здесь; взятие образцов крови или других образцов у субъекта через равные промежутки времени; определение уровня или концентрации аминокислотной последовательности или соединения, описанного здесь, в указанном образце крови; и расчет на основании (из графика) полученных таким способом данных времени, которое потребовалось для снижения уровня или концентрации аминокислотной последовательности или соединения, описанного здесь, на 50% по сравнению с начальным уровнем после дозирования. Ссылка делается, например, на стандартные учебники, такие как Kenneth A. et al., *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists and in Peters et al., Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach* (1996). Ссылка также сделана на Gibaldi M. et al., *Pharmacokinetics*, 2nd Rev. Edition, Marcel Dekker (1982).

Период полувыведения может быть выражен с использованием параметров, таких как  $t_{1/2}$ -альфа,  $t_{1/2}$ -бета,  $HL_{\lambda z}$  и площади под кривой (AUC). В настоящем описании выражение "увеличение периода полувыведения" относится к увеличению любого из этих параметров, любых двух из этих параметров, любых трех из этих параметров или всех четырех из этих параметров. "Увеличение периода полувыведения", в частности, относится к увеличению  $t_{1/2}$ -бета и/или  $HL_{\lambda z}$ , с увеличением или без увеличения  $t_{1/2}$ -альфа и/или AUC, или обоих.

Используемый здесь термин "связанный" относится к ассоциации двух или более молекул. Связь может быть ковалентной или нековалентной. Также, связь может быть генетической (т.е. рекомбинантно слитой). Образование таких связей может быть достигнуто с использованием различных признанных в данной области способов, таких как химическое конъюгирование и выработка рекомбинантного белка.

Термины "диагностика" или "детекция" можно использовать взаимозаменяемо. Диагностика обычно относится к определению тканеспецифического гистологического статуса, тогда как детекция распознает и локализует ткань, поражение или организм, содержащий конкретную детектируемую мишень.

Термин "детектируемый" относится к возможности обнаружить сигнал поверх фонового сигнала. Термин "детектируемый сигнал", используемый здесь в контексте визуализирующих агентов и диагностики, представляет собой сигнал, возникающий в результате применения неинвазивных методов визуализации, таких как, но без ограничения, позитронно-эмиссионная томография (PET). Детектируемый сигнал является детектируемым и отличимым от других фоновых сигналов, которые могут быть генерированы субъектом. Другими словами, существует измеримая и статистически значимая разница между детектируемым сигналом и фоном (например, статистически значимая разница является достаточной разницей для проведения различия между детектируемым сигналом и фоном, такой как разница между детектируемым сигналом и фоном, равная приблизительно 0,1, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 или 40%, или более). Для определения относительной интенсивности детектируемого сигнала и/или фона могут быть использованы стандарты и/или калибровочные кривые.

"Детектируемое эффективное количество" композиции, содержащей визуализирующий агент, описанный здесь, означает количество, которое является достаточным для получения приемлемого изображения с помощью оборудования, доступного для клинического применения. Детектируемое эффективное количество визуализирующего агента, обеспеченного здесь, можно вводить в виде более одной инъекции. Детектируемое эффективное количество может варьировать в зависимости от таких факторов, как степень восприимчивости индивидуума, возраст, пол и вес индивидуума, аллергические реакции индивидуума и т.п. Детектируемые эффективные количества визуализирующих композиций могут также варьировать в зависимости от используемого прибора и методологий. Оптимизация таких факторов находится в пределах компетенции специалиста в данной области.

Термин "введение", используемый здесь в контексте визуализирующих агентов, относится к физическому введению субъекту композиции, содержащей визуализирующий агент, с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области. Предпочтительные способы введения визуализирующих агентов, описанных здесь, включают внутривенный, интраперитонеальный, внутримышечный, подкожный, спинальный или другие парентеральные способы введения, например путем инъекции или инфузии. Используемое здесь выражение "парентеральное вве-

дение" означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, как правило, путем инъекции, и включают, без ограничения, внутривенную, интраперитонеальную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, внутриглазничную, внутрисердечную, интрадермальную, транстрахеальную, подкожную, внутрикожную, внутриартикулярную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию, а также *in vivo* электропорацию. Альтернативно, описанный здесь визуализирующий агент можно вводить непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение может быть также выполнено, например, однократно, многократно и/или в течение одного или нескольких расширенных периодов.

Используемые здесь термины "совместное введение" или т.п. охватывают введение выбранных фармацевтических агентов одному пациенту и предполагают включение режимов, в которых агенты вводятся одинаковыми или разными способами введения, или в одно и то же или разное время.

Термины "пациент" и "субъект" относятся к любому человеку или животному, не относящемуся к человеку, который получает композицию, содержащую визуализирующий агент, описанный здесь. Для применений *in vitro*, таких как *in vitro* диагностические и исследовательские применения, будут подходящими образцы биологических жидкостей и клеток от указанных выше субъектов, такие как образцы крови, мочи или ткани.

Термин "образец" может относиться к образцам ткани, клетки, жидкости и т.п. Образец может быть получен от субъекта. Образец ткани может включать волос (в том числе корни), буккальные мазки, кровь, слюну, семенную жидкость, мышцу или фрагмент любых внутренних органов. Жидкость может представлять собой, но без ограничения, мочу, кровь, асцит, плевральную жидкость, спинномозговую жидкость и т.п. Ткань организма может включать, но без ограничения, ткань кожи, мышцы, эндометрия, матки и шейки матки.

Термин "изотопически чистый" означает, что элемент, соединение или композиция содержит более высокую долю одного изотопа относительно других изотопов. В определенных вариантах осуществления элемент, соединение или композиция является изотопически чистой примерно на более чем 40, 50 или 60%.

Как используется здесь, меченая молекула является "очищенной", когда меченая молекула частично или полностью отделена от немеченых молекул, таким образом, что фракция меченых молекул является обогащенной по сравнению с исходной смесью. "Очищенная" меченая молекула может содержать смесь меченых и немеченых молекул почти в любом соотношении, включая, но без ограничения, примерно 5:95; 10:90; 15:85; 20:80; 25:75; 30:70; 40:60; 50:50; 60:40; 70:30; 75:25; 80:20; 85:15; 90:10; 95:5; 97:3; 98:2; 99:1 или 100:0.

Группа "OTf" относится к трифлату, имеющему формулу  $\text{CF}_3\text{SO}_3$ , или трифторметансульфату.

Термин "галогено" или, альтернативно, "галоген" или "галогенид" означает фтор, хлор, бром или йод.

По всему описанию группы и их заместители могут быть выбраны специалистом в данной области для обеспечения стабильных фрагментов и соединений, а также соединений, полезных в качестве фармацевтически приемлемых соединений, и/или промежуточных соединений, полезных для получения фармацевтически приемлемых соединений.

Различные аспекты, описанные здесь, описаны более подробно в следующих подразделах.

I. Меченые радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  простетические группы.

В одном аспекте в настоящем документе предлагается меченое радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  соединение, содержащее простетическую группу, для использования в биоортогональной реакции, включающей 1,3-диполярное циклоприсоединение между азидом и циклооктином, которая протекает селективно в устойчивых к воде условиях. Меченые радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  простетические группы согласно изобретению растворимы в 100% водной среде и отсутствует необходимость в органической фазе для связывания простетической группы с пептидной или белковой молекулой. Это отличительное свойство является особенно предпочтительным, так как многие биологические препараты (например, пептиды или белки) не могут противостоять даже незначительным количествам органических растворителей, проявляя тенденцию к деградации и агрегации.

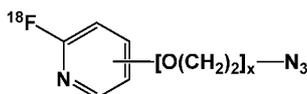
Кроме того, в отличие от алифатических простетических групп, при использовании данной простетической группы реакцию  $^{18}\text{F}$ -фторирования можно контролировать посредством УФ. Меченые радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  простетические группы, описанные здесь, являются нелетучими. Более того, предлагаемые меченые радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  простетические группы могут быть включены в биологические препараты с использованием "не катализируемой медью клик-химии", например, как описано в примерах, избегая, таким образом, проблем, связанных со стабильностью, наблюдаемых в некоторых биологических препаратах при использовании катализируемой медью клик-химии.

В одном аспекте в настоящем документе предлагается пэгилированный  $^{18}\text{F}$ -пиридин, ковалентно связанный с азидом, имеющий следующую структуру:



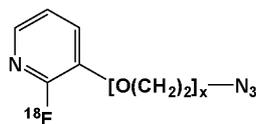
или его фармацевтически приемлемая соль, где  $x$  представляет собой целое число от 1 до 8. В некоторых вариантах осуществления  $x$  представляет собой целое число от 2 до 6. В некоторых вариантах осуществления  $x$  представляет собой целое число от 3 до 5. В некоторых вариантах осуществления  $x$  равно 4. В родственных вариантах осуществления <sup>18</sup>F присоединен к пиридину в орто-положении относительно атома N. В некоторых вариантах осуществления фрагмент  $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$  присутствует в 1-3 конфигурации относительно азота на пиридиновом кольце. В некоторых вариантах осуществления фрагмент  $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$  присутствует в 1-2 конфигурации относительно азота на пиридиновом кольце. В других вариантах осуществления фрагмент  $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$  присутствует в 1-4 конфигурации относительно азота на пиридиновом кольце.

В некоторых вариантах осуществления предлагается меченое радиоактивным изотопом <sup>18</sup>F соединение, имеющее структуру



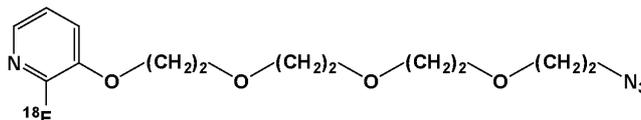
или его фармацевтически приемлемая соль, где  $x$  представляет собой целое число от 1 до 8. В некоторых вариантах осуществления  $x$  представляет собой целое число от 2 до 6. В некоторых вариантах осуществления  $x$  представляет собой целое число от 3 до 5. В некоторых вариантах осуществления  $x$  равно 4. В некоторых вариантах осуществления фрагмент  $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$  присутствует в 1-3 конфигурации относительно азота на пиридиновом кольце. В некоторых вариантах осуществления фрагмент  $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$  присутствует в 1-2 конфигурации относительно азота на пиридиновом кольце. В других вариантах осуществления фрагмент  $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$  присутствует в 1-4 конфигурации относительно азота на пиридиновом кольце.

В некоторых вариантах осуществления предлагается меченое радиоактивным изотопом <sup>18</sup>F соединение, имеющее структуру



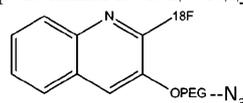
где  $x$  представляет собой целое число от 1 до 8. В некоторых вариантах осуществления  $x$  представляет собой целое число от 2 до 6. В некоторых вариантах осуществления  $x$  представляет собой целое число от 3 до 5. В некоторых вариантах осуществления  $x$  равно 4.

В некоторых вариантах осуществления меченое радиоактивным изотопом <sup>18</sup>F соединение представляет собой [<sup>18</sup>F]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридин (<sup>18</sup>F-FPPEGA) и имеет структуру



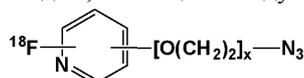
В альтернативных вариантах осуществления меченая радиоактивным изотопом <sup>18</sup>F простетическая группа может содержать дополнительные группы на пиридиновом кольце, которые не препятствуют реакции фторирования. В определенных вариантах осуществления добавления к пиридиновому кольцу включают  $\text{C}_{1-6}$ -алкильные группы, например метил, этил или пропил.

В еще других вариантах осуществления меченая радиоактивным изотопом <sup>18</sup>F простетическая группа представляет собой систему конденсированных колец следующей структуры:



где "OPEG" представляет собой  $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$  и  $x$  представляет собой целое число от 1 до 8. В некоторых вариантах осуществления  $x$  представляет собой целое число от 2 до 6. В некоторых вариантах осуществления  $x$  представляет собой целое число от 3 до 5. В некоторых вариантах осуществления  $x$  равно 4.

В родственном аспекте в настоящем документе предлагается способ получения пэгиллизованного <sup>18</sup>F-пиридина, ковалентно связанного с азидом, имеющего следующую структуру:

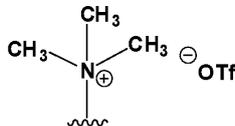


где  $x$  представляет собой целое число от 1 до 8, при этом способ включает следующие стадии:

(а) обеспечение раствора соединения a, имеющего следующую структуру:



где x представляет собой целое число от 1 до 8 и R представляет собой NO<sub>2</sub>, Br, F или



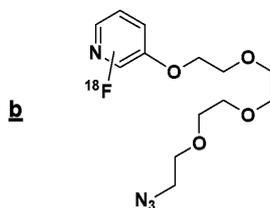
и находится в орто-положении относительно атома N пиридинового кольца;

(b) обеспечение смеси <sup>18</sup>F в <sup>18</sup>O-воде, 4,7,13,16,21,24-гексаокса-1,10-диазабицикло[8.8.8]гексакозана и слабого основания;

(c) сушку смеси, полученной на стадии (b), с образованием твердого вещества; и

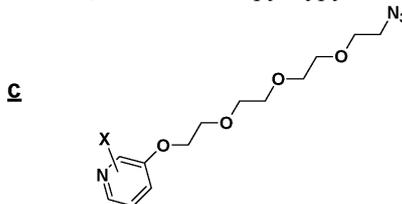
(d) реакцию раствора, полученного на стадии (a), с твердым веществом, полученным на стадии (c), с образованием <sup>18</sup>F-меченого соединения.

В определенных вариантах осуществления способ обеспечивает получение простетической группы <sup>18</sup>F-пиридина следующей структуры b:

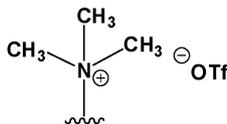


(где <sup>18</sup>F находится в орто-положении относительно атома N), и включает следующие стадии:

(а) обеспечение раствора соединения, имеющего структуру



(где X находится в орто-положении относительно атома N), где X представляет собой NO<sub>2</sub>, Br или

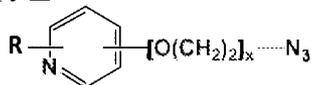


(b) обеспечение смеси <sup>18</sup>F в <sup>18</sup>O-воде, 4,7,13,16,21,24-гексаокса-1,10-диазабицикло[8.8.8]гексакозана и слабого основания, такого как K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>;

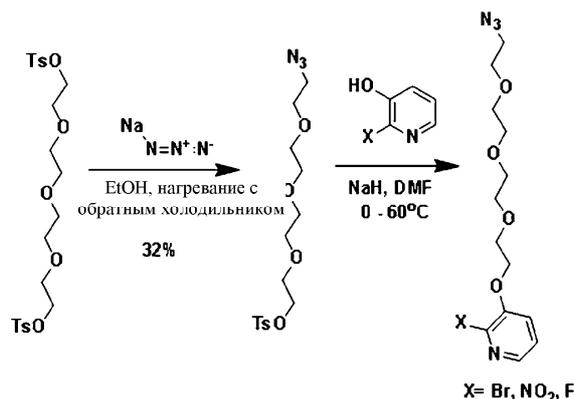
(c) сушку смеси, полученной на стадии (b), с образованием твердого вещества; и

(d) реакцию раствора, полученного на стадии (a), с твердым веществом, полученным на стадии (c), с образованием <sup>18</sup>F-меченого соединения.

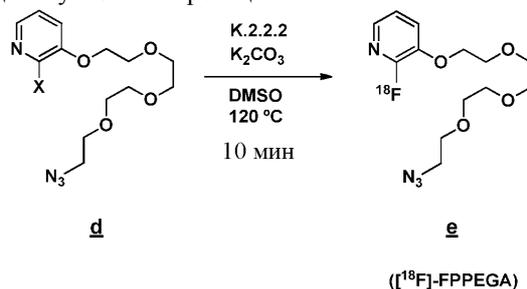
В определенных вариантах осуществления способ, кроме того, включает стадию получения соединения, имеющего следующую структуру a:



в соответствии со схемой I, показанной ниже:

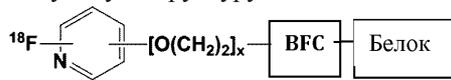


В определенных вариантах осуществления способ включает получение  $^{18}\text{F}$ -пиридиновой протетической группы [ $^{18}\text{F}$ ]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокс)этокс)этокс)этокс)этокс)-2-фторпиридин ( $^{18}\text{F}$ -FPPEGA), e, из d, в соответствии со следующими условиями реакции:



II. Биологические зонды, меченые радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$ .

В определенных аспектах в настоящем документе предлагаются меченые радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  зонды или агенты, имеющие следующую структуру:



где x представляет собой целое число от 1 до 8. В некоторых вариантах осуществления x представляет собой целое число от 2 до 6. В некоторых вариантах осуществления x представляет собой целое число от 3 до 5. В некоторых вариантах осуществления x равно 4.

BFC.

Бифункциональные хелаторы или конъюгирующие (BFC) фрагменты, которые могут быть использованы в радиоактивно меченых композициях, описанных здесь, являются коммерчески доступными (например, Sigma Aldrich; Click Chemistry Tools) или могут быть синтезированы в соответствии с хорошо известными химическими реакциями.

В определенных вариантах осуществления BFC выбран из агентов на основе циклооктина (например, DBCO, DIBO), DFO, DOTA и его производных (CB-DO2A, 3p-C-DEPA, TCMC, Oxo-DO3A), TE2A, CB-TE2A, CB-TE1A1P, CB-TE2P, MM-TE2A, DM-TE2A, diamsar и производных, NODASA, NODAGA, NOTA, NETA, TACN-TM, DTPA, 1B4M-DTPA, CHX-A"-DTPA, TRAP (PRP9), NOPO, AAZTA и производных (DATA), хелатообразующих агентов на основе  $\text{H}_2\text{dedpa}$ ,  $\text{H}_4\text{octaпа}$ ,  $\text{H}_2\text{azapa}$ ,  $\text{H}_5\text{decapa}$ ,  $\text{H}_6\text{phosпа}$ , HBED, SHBED, ВРСА, CP256, PСТА, НЕНА, РЕРА, EDTA, ТЕТА и TRITA, и близких аналогов и их производных. Подходящие комбинации хелатообразующих агентов и радионуклидов подробно описаны в Price et al., Chem. Soc. Rev., 2014; 43:260-90.

В определенных вариантах осуществления BFC представляет собой циклооктин, содержащий реакционноспособную группу, которая образует ковалентную связь с аминовой, карбоксильной, карбонильной или тиольной функциональной группой на нацеливающем белке или пептиде. Реакционноспособные группы на циклооктине включают сложные эфиры, кислоты, гидроксильные группы, аминоксигруппы, малеимиды,  $\alpha$ -галогенкетоны и  $\alpha$ -галогенацетамиды.

В определенных вариантах осуществления BFC представляет собой циклооктин, такой как дибензоциклооктин (DIBO), биарилазациклооктин (BARAC), диметоксиазациклооктин (DIMAC) и дибензоциклооктин (DBCO). В определенных вариантах осуществления циклооктин представляет собой DBCO.

В определенных вариантах осуществления циклооктин содержит в качестве гидрофильной спейсерной группы полиэтиленгликоль (PEG)<sub>y</sub>, где y представляет собой целое число от 1 до 8. В определенных вариантах осуществления y представляет собой целое число от 2 до 6. В определенных вариантах осуществления y равно 4 или 5.

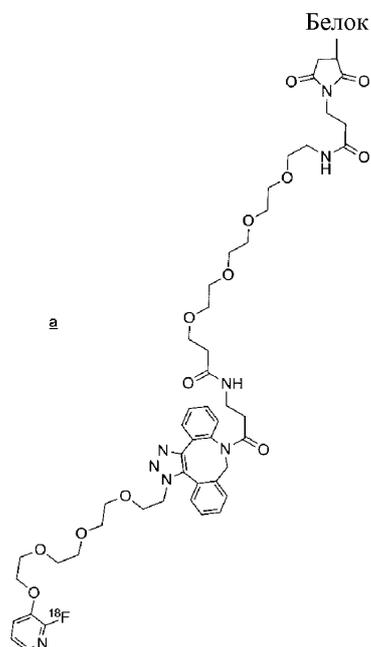
В определенных вариантах осуществления BFC представляет собой DBCO-PEG4-NHS-сложный эфир или DBCO-сульфо-NHS-сложный эфир, который взаимодействует специфически и эффективно с

первичным амином (например, боковой цепью остатков лизина или покрытыми аminosиланом поверхностями). В определенных вариантах осуществления BFC представляет собой DBCO-PEG4-кислоту с концевой карбоновой кислотой (-COOH), которая может взаимодействовать с группами первичного или вторичного амина в присутствии активаторов (например, EDC) с образованием стабильной амидной связи. В определенных вариантах осуществления BFC представляет собой DBCO-PEG4-амин, который вступает во взаимодействие с карбоксильными группами в присутствии активаторов (например, EDC или DCC) или с активированными сложными эфирами (например, сложными эфирами NHS) с образованием стабильных амидных связей.

В определенных вариантах осуществления BFC представляет собой DBCO-PEG4-малеимид, который взаимодействует с сульфгидрильными группами на остатках цистеина, например, остатках цистеина вблизи С-конца полипептида.

В определенных вариантах осуществления для мечения белка указанный белок сначала модифицируют с целью включения цистеина для присоединения простетической группы. Например, цистеин может быть добавлен к С-концу белка. В определенных вариантах осуществления  $R_xS_y$ , где R представляет собой пролин, S представляет собой цистеин, x представляет собой целое число, которое равно по меньшей мере 0 (например, 0, 1 или 2) и y представляет собой целое число, которое равно по меньшей мере 1, добавляют к С-концу белка. Способы модифицирования белков хорошо известны в данной области.

В определенных вариантах осуществления меченый радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  зонд или агент имеет следующую структуру а:



при этом BFC конъюгирован с белком через остаток цистеина.

Меченые радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  нацеливающие агенты, описанные здесь, могут быть получены с использованием биоортогональной, не катализируемой металлом клик-химии в среде, подходящей для прямого использования *in vivo* (например, солевом растворе), в соответствии с описанными здесь процедурами.

### III. Белковые/пептидные нацеливающие молекулы.

$^{18}\text{F}$ -простетические группы, представленные здесь, могут быть присоединены практически к любой нацеливающей молекуле, при условии, что она содержит дериватируемую группу, которая может быть модифицирована без нарушения взаимодействия между нацеливающей молекулой и *in vivo* биологической мишенью (например, клеткой или тканью).

В некоторых вариантах осуществления нацеливающая молекула представляет собой пептид или белок, включая, но без ограничения, антитела, фрагменты антител, молекулы на основе фибронектина и лиганды (например, гормоны, факторы роста, цитокины, хемокины, интерлейкины и ангиогенные факторы). В некоторых вариантах осуществления нацеливающая молекула содержит один или несколько участков для связывания с мишенью, ассоциированной с заболеванием или состоянием, такой как опухоль-ассоциированный или аутоиммунный антиген, или белок, представленный на поверхности патогенного организма, такого как вирус, бактерия, гриб или простейшие.

В некоторых вариантах осуществления  $^{18}\text{F}$ -меченые пептиды или белок могут быть выбраны для связывания напрямую с целевой клеткой, тканью, патогенным организмом или другой мишенью для визуализации и/или детекции. В других вариантах осуществления  $^{18}\text{F}$ -меченый белок или пептид может быть выбран для связывания напрямую или опосредованно *in vivo* с молекулой-мишенью. Например,

субъекту можно вводить первый белок или пептид с последующей второй  $^{18}\text{F}$ -меченой молекулой, которая связывается с первым белком или пептидом.

#### Пептиды.

Пептиды, имеющие не менее двух аминокислотных остатков, предпочтительно от двух до десяти остатков, можно использовать, а также сочетать с другими фрагментами. Нацеливаемая конструкция может также содержать неприродные аминокислоты, например, D-аминокислоты в структуре основной цепи для повышения стабильности пептида *in vivo*. В альтернативных вариантах осуществления могут быть использованы другие структуры основной цепи, например сконструированные из неприродных аминокислот или пептоидов.

В некоторых вариантах осуществления пептиды, которые могут быть использованы, включают лиганды, пептидные вакцины и эпитопы. Пептиды, используемые в качестве нацеливаемых конструкций, удобным образом могут быть синтезированы на автоматическом пептидном синтезаторе с использованием твердофазной подложки и стандартных методов повторной ортогональной депротекции и сочетания. N-концевые остатки могут быть ацетилированы для повышения стабильности в сыворотке. Такие защитные группы известны специалистам в данной области. См. Greene and Wuts *Protective Groups in Organic Synthesis*, 1999 (John Wiley and Sons, N.Y.).

#### Антитела.

В определенных вариантах осуществления нацеливающая молекула, используемая в композиции радиотрейсера, описанной здесь, представляет собой антитело. Используемый здесь термин "антитело" может включать целые антитела и любые антигенсвязывающие фрагменты (т.е. "антигенсвязывающие части") или их единичные цепи. В качестве примера "антитело" может относиться как к природным, так и к неприродным антителам; моноклональным и поликлональным антителам; химерным и гуманизированным антителам; человеческим и нечеловеческим антителам; биспецифическим антителам; полностью синтетическим антителам; и одноцепочечным антителам. Используемый здесь термин "антиген" относится к любому природному или синтетическому иммуногенному веществу, такому как белок, пептид или гаптен.

Нацеливающие молекулы, описанные здесь, могут включать любое антитело или фрагмент, который, как известно в данной области, обладает специфичностью связывания в отношении антигенамишени, ассоциированного с заболеванием или состоянием. Антитела, полезные в качестве нацеливающих молекул, могут быть получены коммерчески из различных источников (например, АТТС, Manassas, VA) и/или иметь опубликованные последовательности варьируемых областей, которые могут быть получены в соответствии с признанными в данной области рекомбинантными методами. В некоторых вариантах осуществления иллюстративные антитела для использования в способах по настоящему изобретению включают анти-CTLA-4 антитело, анти-PD-1 антитело, анти-PDL-1 антитело, анти-OX40 (также известное как CD134, TNFRSF4, ACT35 и/или TXGP1L) антитело или анти-LAG-3 антитело.

Антитела, используемые в композициях и способах, описанных здесь, могут быть получены с использованием различных известных методов. Протоколы иммунизации и методы выделения иммунизированных спленоцитов хорошо описаны в данной области. Также, обычным является получение моноклональных антител с использованием стандартных методов гибридизации соматических клеток, описанных Kohler и Milstein, *Nature* 256: 495 (1975), а также вирусной или онкогенной трансформации В-лимфоцитов, методов фагового дисплея с использованием библиотек генов человеческих антител. Кроме того, стандартные методологии получения химерных и гуманизированных антител являются легкодоступными (см., например, патент США 4816567, выданный Cabilly et al.; патент США 5225539, выданный Winter, и патенты США 5530101; 5585089; 5693762 и 618370, выданные Queen et al.).

В определенных вариантах осуществления нацеливающая молекула, используемая в композиции радиотрейсера, представляет собой антигенсвязывающий фрагмент. Используемый здесь термин "антигенсвязывающая часть" антитела относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающая часть" антитела, включают (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов  $V_L$ ,  $V_H$ , CL и CH1; (ii)  $F(ab')_2$ -фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов  $V_H$  и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов  $V_L$  и  $V_H$  в едином плече антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546), который состоит из домена  $V_H$ ; и (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR), или (vii) комбинацию двух или нескольких выделенных CDR, которые могут быть необязательно соединены синтетическим линкером. Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента,  $V_L$  и  $V_H$ , кодируются разными генами, они могут быть соединены при помощи рекомбинантных способов с использованием синтетического линкера, который дает возможность их получения в виде единой белковой цепи, в которой области  $V_L$  и  $V_H$  спариваются с образованием моновалентных молекул, известных как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; и Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Предполагается, что такие одноцепочечные антитела также включены в термин "антигенсвязывающая часть" антитела. Эти и другие потенциальные конструкции описаны Chan & Carter (2010) *Nat. Rev. Immunol.* 10:301.

Такие фрагменты антител получают с использованием общепринятых способов, известных специалистам в данной области, и эти фрагменты подвергают скринингу на возможность использования таким же образом, как и интактные антитела. Антигенсвязывающие части могут быть получены с помощью методов рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов.

В определенных вариантах осуществления используемое антитело модифицируют для модулирования, например, уменьшения периода полувыведения антитела или быстрого клиренса для применения в способах медицинской визуализации, описанных в настоящем документе. Модификации, такие как I253A (Hornick et al. (2000) *J. Nucl. Med.* 41:355) и H435A/R I253A или H310A (Kim et al. (2000) *Eur. J. Immunol.* 29:2819) в Fc-участке человеческого IgG1, могут уменьшать связывание с FcRn. См. также Kapanova et al. (2005) *Cancer Res.* 65:622. Другие способы ускорения клиренса включают форматирование антигенсвязывающих доменов согласно настоящему изобретению в виде фрагментов антитела, лишенных способности связываться с FcRn, таких как Fab-фрагменты. Такая модификация может уменьшать период полувыведения антитела из системы циркуляции, составляющий от пары недель до нескольких часов. Затем, при необходимости, можно использовать селективное пэгилирование фрагментов антитела для тонкой регулировки (пошагового увеличения) периода полувыведения фрагментов антитела. Charman et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:780.

Композиции радиотрейсера, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, могут быть подвергнуты анализу в отношении сохранения специфичности связывания *in vitro* и/или *in vivo*. Способы анализа аффинности связывания, кросс-реактивности и кинетики связывания различных композиций антител включают стандартные анализы, известные в данной области, например, ELISA, Вестерн-блоттинг, проточную цитометрию и анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) BIACORE® с использованием инструмента BIACORE® 2000 SPR (Biacore AB, Uppsala, Sweden).

Иллюстративные белки для использования в радиоактивно меченых зондах, описанных здесь, включают любое известное антитело или альтернативные каркасные белки, такие как Аднектины, которые специфически связываются с мишенью и значительно не вступают в перекрестную реакцию с несвязанными мишенями.

Белок на основе фибронектина (FBS).

В некоторых вариантах осуществления нацеливающая молекула, используемая в композициях радиотрейсера, описанных здесь, представляет собой белок FBS. Как правило, молекулам белка FBS присущи высокие скорости выведения из крови, что может быть предпочтительным для использования с <sup>18</sup>F в методах визуализации, сводя к минимуму количество времени, необходимое для получения фоновых сигналов зонда от нерелевантной ткани. Быстро выводимые зонды обеспечивают высококонтрастные изображения, которые получают в день введения зонда, и что очень важно, могут также способствовать снижению общего воздействия радиации на субъекта.

Используемый здесь "каркас на основе фибронектина" или белок или фрагмент "FBS" относится к белкам или фрагментам, которые основаны на повторе фибронектина типа III ("Fn3"). Fn3 представляет собой малый (около 10 кДа) домен, который имеет структуру, подобную укладке цепей иммуноглобулина (Ig) (т.е. Ig-подобную β-сэндвич-структуру, состоящую из семи β-цепей и шести петель). Фибронектин имеет 18 повторов Fn3, и хотя гомология последовательностей между повторами является низкой, все они имеют высокое сходство третичной структуры. Домены Fn3 также присутствуют во многих белках, отличных от фибронектина, таких как молекулы клеточной адгезии, молекулы клеточной поверхности, например рецепторы цитокинов и домены, связывающие углеводы. Для обзора см. Bork et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(19):8990-8994 (1992); Bork et al., *J. Mol. Biol.*, 242(4):309-320 (1994); Campbell et al., *Structure*, 2(5):333-337 (1994); Harpez et al., *J. Mol. Biol.*, 238(4):528-539 (1994)). Термин белок или фрагмент "FBS" понимается как включающий каркасы на основе доменов Fn3 из этих других белков (т.е. молекул, не относящихся к фибронектину).

Домен Fn3 является малым, мономерным, растворимым и стабильным. Он лишен дисульфидных связей и, следовательно, является стабильным в восстановительных условиях. Домены Fn3 содержат в направлении от N-конца к C-концу бета-цепь или бета-подобную цепь A; петлю AB; бета-цепь или бета-подобную цепь B; петлю BC; бета-цепь или бета-подобную цепь C; петлю CD; бета-цепь или бета-подобную цепь D; петлю DE; бета-цепь или бета-подобную цепь E; петлю EF; бета-цепь или бета-подобную цепь F; петлю FG; и бета-цепь или бета-подобную цепь G. Семь антипараллельных β-цепей организованы в виде двух бета-листов, которые образуют стабильное ядро, создавая при этом две "лицевые поверхности", состоящие из петель, которые соединяют бета-цепи или бета-подобные цепи. Петли AB, CD и EF расположены на одной "лицевой стороне" ("южный полюс") и петли BC, DE и FG расположены на противоположной "лицевой стороне" ("северный полюс"). В человеческом фибронектине существует по меньшей мере 15 различных модулей Fn3 и хотя гомология последовательностей между модулями является низкой, все они обладают высоким сходством третичной структуры.

Петли в молекулах Fn3 являются структурно сходными с определяющими комплементарность областями (CDR) антител и в случае их изменения могут участвовать в связывании молекулы Fn3 с мише-

нию, например белком-мишенью. Другие области молекул Fn3, такие как бета-цепи или бета-подобные цепи, и N-концевые или C-концевые области, в случае их изменения также могут участвовать в связывании с мишенью. Любая или все из петель AB, BC, CD, DE, EF и FG могут участвовать в связывании с мишенью. Любая из бета-цепей или бета-подобных цепей может участвовать в связывании с мишенью. Домены Fn3 могут также связываться с мишенью посредством одной или нескольких петель, и одной или нескольких бета-цепей или бета-подобных цепей. Для связывания могут также потребоваться N-концевые или C-концевые области. Для использования в белке домен FBS может содержать все петли, все бета-цепи или бета-подобные цепи, или только часть из них, при этом определенные петли и/или бета-цепи или бета-подобные цепи, и/или N- или C-концевые области являются модифицированными (или измененными), при условии, что домен FBS предпочтительно связывается специфически с мишенью. Например, домен FBS может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 петель, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 бета-цепей, и обязательно N-концевую и/или C-концевую область, при этом одна или несколько петель, одна или несколько бета-цепей, N-концевая область и/или C-концевые области являются модифицированными относительно домена FBS дикого типа.

Примером белков FBS, которые основаны на доменах <sup>10</sup>Fn3 человека, являются Аднектины (компания Adnexus, принадлежащая фармкомпани Bristol-Myers Squibb). Аднектины представляют собой молекулы <sup>10</sup>Fn3, в которых CDR-подобные петлевые области, (3-цепи, N-концевые и/или C-концевые области домена <sup>10</sup>Fn3 модифицированы для создания белка, способного связываться с представляющим интерес соединением. Например, в патенте США 7115396 описаны белки на основе домена <sup>10</sup>Fn3, в которых изменения в петлях BC, DE и FG приводят к образованию белков, связывающихся с высокой аффинностью с TNF $\alpha$  (фактор некроза опухоли альфа). (В патенте США 7858739 описаны белки на основе домена Fn3, в которых изменения в петлях BC, DE и FG приводят к образованию белков, связывающихся с высокой аффинностью с VEGFR2 (рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 подтипа).

В определенных вариантах осуществления фрагмент FBS основан на повторе Fn3, который отличается от 10<sup>го</sup> повтора домена типа III фибронектина, например человеческого фибронектина. Например, фрагмент FBS может обладать сходством с любым из других повторов типа III фибронектина, например 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 10-, 12-, 13-, 14-, 15-, 16-, 17- и 18-м повтором Fn3. В еще других вариантах осуществления фрагмент FBS может происходить из молекулы, отличной от фибронектина. Иллюстративные фрагменты FBS могут быть получены из тенасцина, белка, который состоит из 15 доменов Fn3, обладающих сходствами последовательностей друг с другом, аналогичными обнаруженным в фибронектине. Эти повторы описаны, например, в Jacobs et al., Protein Engineering, Design & Selection, 25:107 (2012). На основе гомологии повторов в молекуле фибронектина и гомологии повторов в молекуле тенасцина создавали искусственные молекулы, основанные на этих гомологиях. Белки, содержащие консенсусную аминокислотную последовательность на основе гомологии доменов в молекуле фибронектина, называются Fibcon и FibconB (WO 2010/093627 и работа Jacobs et al. (2012), указанная выше), и основанные на гомологии доменов в молекуле тенасцина, называются Tенcon (WO 2010/051274, WO 2010/051310 и WO 2011/137319, которые специально включены здесь путем ссылки). Фрагмент Fibcon, FibconB или Tенcon, или их связывающиеся с мишенью варианты, сами или связанные с гетерологичным фрагментом, могут быть слиты, как описано в настоящем документе. Домены Fn3 из других белков, например поверхностные клеточные гормоны и рецепторы цитокинов, шаперонины и домены, связывающие углеводы, могут быть конъюгированы, как описано здесь.

Белки FBS, специфические в отношении любой желательной молекулы-мишени, могут быть созданы и протестированы с использованием известных в данной области способов. Способы тестирования связывающих свойств белков FBS также хорошо известны. Например, одним из способов быстрого получения и тестирования доменов Fn3, обладающих свойствами специфического связывания, является технология слияния нуклеиновая кислота-белок компании Adnexus, принадлежащей фармкомпани Bristol-Myers Squibb R&D Company. В настоящем изобретении используется *in vitro* экспрессия и технология мечения, называемая "PROfusion", в которой используются слияния нуклеиновая кислота-белок (слияния РНК- и ДНК-белок) для идентификации новых полипептидов и аминокислотных мотивов, которые являются важными для связывания с белками. Технология слияния нуклеиновая кислота-белок представляет собой технологию, которая ковалентно связывает белок с его кодирующей генетической информацией. Подробное описание технологии слияния РНК-белок и способов скрининга библиотеки белков с каркасом на основе фибронектина смотри в работе Szostak et al., патентах США 6258558, 6261804, 6214553, 6281344, 6207446, 6518018 и 6818418; Roberts et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1997; 94:12297-12302; и в работе Kurz et al., Molecules, 2000;5:1259-64, все из которых включены в описание посредством ссылки.

Иллюстративные белки или фрагменты FBS включают, но без ограничения, белки и фрагменты, которые связываются с мезотелианом, глипиканом, TL1A, CD8, миостатином, рецепторами LPA1, TNF-альфа, VEGFR2, PCSK9, IL-23, EGFR или IGF1R, а также описанные, например, в заявках WO 2010/093627, WO 2011/130324, WO 2009/083804, WO 2009/133208, WO 02/04523, WO 2012/016245, WO 2009/023184, WO 2010/051310, WO 2011/020033, WO 2011/051333, WO 2011/051466, WO 2011/092233, WO 2011/100700, WO 2011/130324, WO 2011/130328, WO 2011/137319, WO 2010/051274, WO 2009/086116, WO 09/058379, WO 2013/067029 и WO 2012/016245 (специально включенных здесь в каче-

стве ссылки): любой из описанных в этих публикациях белков или фрагментов FBS можно использовать, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления белок FBS связывается с PDL-1. В некоторых вариантах осуществления белок FBS содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

В определенных вариантах осуществления визуализирующий агент, например содержащий белок FBS, связан с фрагментом, который модулирует, например, незначительно увеличивает его РК крови для усиления контрастности изображения или повышения avidности  $^{18}\text{F}$ -меченого нацеливающего агента. В некоторых вариантах осуществления скорость выведения полипептида у млекопитающего (например, мыши, крысы или человека) равна или увеличена более чем в два раза, более чем в три раза, более чем в четыре раза или более чем в пять раз относительно скорости выведения немодифицированного белка FBS. Фрагменты, которые замедляют выведение белка из крови, называемые здесь как "РК-фрагменты", включают полиоксиалкиленовые фрагменты (например, полиэтиленгликоль), сахара (например, сиаловую кислоту) и хорошо переносимые белковые фрагменты (например, Fc и фрагменты, и их варианты, трансферрин или сывороточный альбумин). Белок FBS также может быть слит с альбумином или фрагментом (частью) или вариантом альбумина, как описано в публикации США 2007/0048282, или может быть слит с одним или несколькими связывающими сывороточный альбумин белками FBS, как описано здесь.

Другие РК-фрагменты, которые могут быть использованы в изобретении, включают фрагменты, описанные в работе Kontermann et al., (Current Opinion in Biotechnology 2011;22:868-76), включенной здесь путем ссылки. Такие РК-фрагменты включают, но без ограничения, слияния с человеческим сывороточным альбумином, конъюгаты с человеческим сывороточным альбумином, агенты, связывающие человеческий сывороточный альбумин (например, Аднектин PKE, AlbuDAb, ABD), слияния XTEN, слияния PAS (т.е. рекомбинантные миметики PEG на основе трех аминокислот пролина, аланина, серина), конъюгаты с углеводами (например, гидроксипропилкрахмал (HES)), гликозилирование, конъюгаты полисиаловой кислоты и конъюгаты жирных кислот.

В некоторых вариантах осуществления в изобретении предлагаются  $^{18}\text{F}$ -меченые белки FBS, слитые с РК-фрагментом, а именно, полимерным сахаром. В некоторых вариантах осуществления РК-фрагмент представляет собой полиэтиленгликолевый фрагмент. PEG представляет собой хорошо известный водорастворимый полимер, который коммерчески доступен или может быть получен полимеризацией этиленгликоля с раскрытием кольца согласно способам, известным в данной области (Sandier and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161).

Термин "PEG" используется в широком смысле и охватывает любую молекулу полиэтиленгликоля независимо от размера или модификации на конце PEG, и может быть представлен формулой:  $\text{X-O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , где  $n$  равно 2 или более, например от 20 до 2300, и  $X$  представляет собой  $\text{H}$  или концевую модификацию, например  $\text{C}_{1-4}$ -алкил. PEG может содержать дополнительные химические группы, необходимые для осуществления реакций связывания; которые образуются в результате химического синтеза молекулы; или которые действуют в качестве спейсера для обеспечения оптимального расстояния между частями молекулы. Кроме того, такая молекула PEG может состоять из одной или нескольких боковых цепей PEG, которые связаны вместе. Молекулы PEG с более чем одной цепью PEG называются многоплечевыми или разветвленными PEG. Разветвленные PEG описаны, например, в Европейской публикации 473084A и патенте США 5932462.

Одна или несколько молекул PEG могут быть присоединены в различных положениях на белке, и такое присоединение может быть достигнуто путем взаимодействия с аминами, тиолами или другими подходящими реакционноспособными группами. Аминовый фрагмент может представлять собой, например, первичный амин, расположенный на N-конце полипептида, или аминокислотную группу, присутствующую в аминокислоте, такой как лизин или аргинин. В некоторых вариантах осуществления фрагмент PEG присоединен в положении на полипептиде, выбранном из группы, состоящей из: а) N-конца; б) между N-концом и наиболее N-концевой бета-цепью или бета-подобной цепью; в) петли, расположенной на лицевой стороне полипептида напротив сайта связывания с мишенью; д) между C-концом и наиболее C-концевой бета-цепью или бета-подобной цепью; и е) C-конца.

Пэггилирование может быть достигнуто путем сайт-направленного пэггилирования, при котором подходящую реакционноспособную группу вводят в белок для создания участка, по которому предпочтительно проходит пэггилирование. В некоторых вариантах осуществления белок модифицируют для введения цистеинового остатка в желательное положение, обеспечивая возможность сайт-направленного пэггилирования по цистеину. Мутации могут быть введены в кодирующую белок последовательность для создания остатков цистеина. Это может быть достигнуто, например, путем мутации одного или нескольких аминокислотных остатков на цистеин. Предпочтительные аминокислоты для мутации на остаток цистеина включают серин, треонин, аланин и другие гидрофильные остатки. Предпочтительно, остаток, подлежащий мутации на цистеин, представляет собой остаток, экспонированный на поверхности. В данной области хорошо известны алгоритмы, позволяющие предсказать поверхностную доступность остатков на основе первичной последовательности или белка. Альтернативно, поверхностные остатки могут быть предсказаны путем сравнения аминокислотных последовательностей связывающих полипептидов

при условии, что раскрыта кристаллическая структура каркасного участка, на основе которого создают и разрабатывают связывающие полипептиды (см. Himanen et al., Nature 2001;414:933-8), и, следовательно, идентифицированы экспонированные на поверхности остатки. Пэгирование остатков цистеина можно проводить, например, с использованием PEG-малеимида, PEG-винилсульфона, PEG-йодацетамида или PEG-ортопиридилдисульфида.

Как правило, PEG активируют с помощью активирующей группы, подходящей для связывания с желаемым участком на полипептиде. Способы пэгирования хорошо известны в данной области и, кроме того, описаны в Zalipsky S., et al., "Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides" в Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J.M. Harris, Plenus Press, New York (1992), и в Zalipsky (1995) Advanced Drug Reviews 16: 157-182.

PEG может иметь разную молекулярную массу и может быть разветвленным или линейным. Как правило, среднемассовая молекулярная масса PEG составляет примерно от 100 до 150000 Да. Иллюстративная среднемассовая молекулярная масса PEG составляет около 1000, около 2000, около 5000, около 10000, около 20000, около 40000, около 60000 и около 80000 Да. В определенных вариантах осуществления молекулярная масса PEG составляет около 5000 Да. Могут быть также использованы разветвленные варианты PEG, имеющие общую молекулярную массу, равную любой из указанных выше. В некоторых вариантах осуществления PEG имеет две ветви. В других вариантах осуществления изобретения PEG имеет четыре ветви. В одном варианте осуществления изобретения PEG представляет собой бис-PEG (NOF Corporation, DE-200MA).

Аналогично антителам селективное пэгирование Аднектинов можно использовать для тонкой регулировки (незначительного увеличения) периода полувыведения Аднектинов, при необходимости.

Традиционные методы разделения и очистки, известные в данной области, можно использовать для очистки пэгированных белков FBS, такие как эксклюзионная (например, гель-фильтрация) и ионообменная хроматография. Продукты могут быть также разделены с использованием SDS-PAGE. Продукты, которые могут быть разделены, включают моно-, ди-, три-, поли- и непэгированные Аднектины, а также свободный PEG. Процентное содержание моно-PEG-конъюгатов можно контролировать путем объединения более широких фракций, расположенных вокруг пика элюирования, с целью увеличения процентного содержания моно-PEG в композиции. Наличие примерно 90% моно-PEG-конъюгатов обеспечивает хороший баланс между выходом и активностью.

#### IV. Мишени.

Иллюстративные *in vivo* молекулы-мишени, которые связываются с  $^{18}\text{F}$ -мечеными зондами, описанными здесь, представляют собой такие молекулы-мишени, которые ассоциированы с различными заболеваниями или состояниями, такими как злокачественное заболевание, сердечно-сосудистое заболевание, инфекционное заболевание, воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание или неврологическое заболевание.

В настоящем документе предлагаются  $^{18}\text{F}$ -меченые визуализирующие агенты, например [ $^{18}\text{F}$ ]-фрагмент-4PEG-DBCO-FPPEGA, при этом фрагмент специфически связывается с молекулой-мишенью, такой как белок-мишень на поверхности человеческих клеток. В определенных вариантах осуществления фрагмент представляет собой пептид, антитело или его антигенсвязывающую часть, или вариант антитела; альтернативный каркас, такой как домен Fn3 (например, Fn3 человека), такой как FBS, например, домен  $^{10}\text{Fn3}$  человека. В определенных вариантах осуществления фрагмент связывается с молекулой клеточной поверхности, например молекулой клеточной поверхности на опухолевой клетке или клетке внутри опухоли, например опухоль-инфильтрующем лимфоците, который локализован внутри опухоли. В определенных вариантах осуществления фрагмент связывается с молекулой клеточной поверхности на иммунной клетке, например Т-клетке (например, клетке Treg), клетке Teff, В-клетке, макрофаге, дендритной клетке, NK клетке или клетке Лангерганса.

В определенных вариантах осуществления  $^{18}\text{F}$ -меченый визуализирующий агент содержит фрагмент, который связывается специфически с иммуно-онкологической мишенью (рецептором или лигандом), такой как костимулирующий рецептор на иммунной клетке (например, Т-клетке или NK-клетке), или ингибитор на иммунной клетке (например, Т-клетке или NK-клетке), при этом мишени модулируют иммунные ответы. В одном варианте осуществления фрагмент связывается с одной из следующих молекул или их лигандом или рецептором: член суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF); член семейства B7, которое включает B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) и B7-H6; член суперсемейства TNF-рецепторов или его лиганд, например, CD40, CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137, GITR, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT $\beta$ R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, лимфотоксин  $\alpha$ /TNF $\beta$ , TNFR2, TNF $\alpha$ , LT $\beta$ R, лимфотоксин  $\alpha$ 1 $\beta$ 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY, NGFR (см., например, Tansey (2009) Drug Discovery Today 00:1); белок, который ингибирует иммунную клетку (например, ингибиторы контрольных точек иммунного ответа), такой как CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2 и LAG-3, TIM-3, галектин-9, CEACAM-1, BTLA, CD69, галектин-1, TIGIT,

CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, CD73, PD1H, LAIR1, TIM-1, TIM-4, CD39; белок, который стимулирует иммунный ответ, такой как B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, GITR, GITRL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, CD70, CD27, CD40, DR3 и CD28H; любую из следующих молекул клеточной поверхности: рецепторы KIR, цитокина или интерлейкина, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF, CSF-1R, CD25 и IDO.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающая молекула связывается с антигеном или рецептором патогена, включая, но без ограничения, грибы, вирусы, паразиты и бактерии. Примеры патогенных вирусов, которые можно обнаружить описанными в настоящем документе способами, включают вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатит (A, B или C), вирус герпеса (например, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II и CMV, вирус Эпштейна-Барра), аденовирус, вирус гриппа, флавивирусы, эховирус, риновирус, вирус Коксаки, коронавирусы, респираторно-синцитиальный вирус, вирус паротита, ротавирус, вирус кори, вирус краснухи, парвовирус, вирус коровьей оспы, HTLV-вирус, вирус Денге, папилломавирус, вирус контагиозного моллюска, полиовирус, вирус бешенства, JC-вирус и вирус абровирусного энцефалита, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус герпеса, цитомегаловирус, вирус бешенства, вирус гриппа, вирус гепатита B, вирус Сендай, вирус лейкоза кошек, реовирус, полиовирус, подобный парвовирусу вирус сыворотки человека, обезьяний вирус 40, респираторно-синцитиальный вирус, мышинный вирус опухоли молочной железы, вирус ветряной оспы, вирус Денге, вирус краснухи, вирус кори, аденовирус, вирусы Т-клеточного лейкоза человека, вирус Эпштейна-Барра, вирус мышинного лейкоза, вирус эпидемического паротита, вирус везикулярного стоматита, вирус Синдбис, вирус лимфоцитарного хориоменингита, вирус папилломы человека, вирус синего языка. Примеры бактерий и грибов включают стрептококк агалактия (*Streptococcus agalactiae*), легионеллы (*Legionella pneumophila*), стрептококк пиогенес (*Streptococcus pyogenes*), кишечную палочку (*Escherichia coli*), гонококк Нейссера (*Neisseria gonorrhoeae*), менингококк (*Neisseria meningitidis*), пневмококк (*Pneumococcus*), палочку Пфайфера (*Neisseria meningitidis*), трепонему паллидум (*Treponema pallidum*), спирохеты - возбудители болезни Лайма (*Lyme disease spirochetes*), псевдомонас азругинозу (*Pseudomonas aeruginosa*), палочку Хансена (*Mycobacterium leprae*), бруцеллы (*Brucella abortus*), микобактерии туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis*) и столбнячную палочку (*Chlostridium tetani*).

Некоторые примеры патогенных бактерий, вызывающих инфекции, которые можно обнаружить с помощью описанных в настоящем документе способов, включают хламидии, бактерии риккетсии, микобактерии, стафилококки, стрептококки, пневмококки, менингококки и гонококки, клебсиеллу, протей, серрации, синегнойную палочку, легионеллы, дифтерийные бактерии, сальмонеллы, бациллы, возбудители холеры, возбудители столбняка, возбудитель ботулизма, сибирской язвы, возбудитель чумы, возбудитель лептоспироза и бактерии, вызывающие болезнь Лайма.

Некоторые примеры патогенных грибов, вызывающих инфекции, которые можно обнаружить с помощью описанных в настоящем документе способов, включают *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis* и т.д.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, и т.д.), род *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*.

Некоторые примеры патогенных паразитов, вызывающих инфекции, которые можно обнаружить с помощью описанных в настоящем документе способов, включают дизентерийную амебу *Entamoeba histolytica*, балантидий *Balantidium coli*, Неглерию Фоулера *Naegleria fowleri*, акантамебу *Acanthamoeba* sp., кишечные лямблии *Giardia lamblia*, криптоспоридии *Cryptosporidium* sp., пневмоцисты *Pneumocystis carinii*, плазмодии *Plasmodium vivax*, бабезии *Babesia microti*, трипаносому бруцеи *Trypanosoma brucei*, трипаносому крузи *Trypanosoma cruzi*, лейшмании *Leishmania donovani*, токсоплазму гонди *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*.

#### V. Биофизические и биохимические характеристики.

Связывание нацеленных на белок молекул, описанных здесь, с молекулой-мишенью можно оценить в отношении констант равновесия (например, диссоциации,  $K_D$ ) и кинетических констант (например, константы скорости ассоциации  $k_{on}$  и константы скорости диссоциации  $k_{off}$ ). Молекула, нацеленная на белок, как правило, связывается с молекулой-мишенью с  $K_D$  менее чем 500, 100, 10, 1 нМ, 500, 200 или 100 пМ, хотя более высокие значения  $K_D$  могут быть допустимыми, когда значение  $k_{off}$  является достаточно низким или  $k_{on}$  является достаточно высоким.

Иллюстративные анализы для определения аффинности связывания нацеленной на белок молекулы включают, но без ограничения, твердофазные способы, такие как метод кинетического эксклюзионного анализа (Kinetic Exclusion Assay - KinExA) (Blake et al., JBC 1996; 271:27677-85; Drake et al., Anal Biochem 2004; 328:35-43), метод поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием прибора Biacore (Uppsala, Sweden) (Welford et al., Opt. Quant. Elect 1991; 23:1; Morton and Myszk, Methods in Enzymology 1998; 295:268) и метод гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF) (Newton et al., J. Biomol. Screen, 2008; 13:674-82; Patel et al., Assay Drug Dev. Technol., 2008; 6:55-68).

В определенных вариантах осуществления биомолекулярные взаимодействия наблюдали в режиме реального времени с помощью системы Biacore, работающей на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (SPR), для детекции изменений резонансного угла света на поверхности тонкой золотой пленки, нанесенной на стеклянную подложку, вследствие изменений показателя преломления поверхности до

300 нм. С помощью системы Biacore измеряли константы скорости ассоциации, константы скорости диссоциации, константы равновесной диссоциации и константы аффинности. Аффинность связывания вычисляли из констант скорости ассоциации и диссоциации, измеренных с помощью системы поверхностного плазмонного резонанса Biacore (Biacore, Inc.). Биосенсорный чип активировали для ковалентного связывания мишени. Мишень затем разбавляли и вводили путем инъекции через чип для получения сигнала в единицах отклика иммобилизованного вещества. Так как сигнал в единицах отклика (RU) пропорционален массе иммобилизованного вещества, это представляет диапазон плотностей иммобилизованной мишени на матрице. Данные по ассоциации и диссоциации получали одновременно в результате подгонки данных к модели бимолекулярного взаимодействия 1:1 с получением величин наилучшего согласия для  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  и  $R_{max}$  (максимальный отклик при насыщении). Равновесные константы диссоциации для связывания,  $K_D$ , вычисляли из данных измерений SPR в виде  $k_{off}/k_{on}$ .

В некоторых вариантах осуществления нацеленные на белок молекулы, описанные здесь, показали значение  $K_D$  в анализе аффинности SPR 500 нМ или менее, 400 нМ или менее, 300 нМ или менее, 200 нМ или менее, 150 нМ или менее, 100 нМ или менее, 90 нМ или менее, 80 нМ или менее, 70 нМ или менее, 60 нМ или менее, 50 нМ или менее, 40 нМ или менее, 30 нМ или менее, 20 нМ или менее, 15 нМ или менее, 10 нМ или менее, 5 нМ или менее или 1 нМ или менее.

Следует понимать, что анализы, описанные выше в настоящем документе, являются иллюстративными и что любой известный в данной области способ определения аффинности связывания между белками (например, резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET), иммуноферментный анализ и конкурентные анализы связывания (например, радиоиммуноанализы)), можно использовать для оценки аффинности связывания нацеленных на белок молекул, описанных здесь.

#### VI. Составы.

Кроме того, в настоящем документе предлагаются композиции, например, фармацевтические композиции, содержащие один или комбинацию  $^{18}F$ -меченых нацеливающих агентов, описанных здесь, составленных вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут включать один агент или комбинацию (например, два или несколько различных) агентов, описанных здесь. Например, фармацевтическая композиция, описанная здесь, может содержать комбинацию  $^{18}F$ -меченого нацеливающего агента и лекарственного средства.

Используемый здесь "фармацевтически приемлемый носитель" включает любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно носитель является подходящим для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). В зависимости от способа введения  $^{18}F$ -меченый нацеливающий агент может быть покрыт материалом для защиты соединения от действия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать данное соединение.

Фармацевтические соединения, описанные здесь, могут включать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. Термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет желаемую биологическую активность исходного соединения и не вызывает никаких нежелательных токсикологических эффектов (см., например, Berge S.M., et al. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Примеры таких солей включают кислотнo-аддитивные соли и основно-аддитивные соли. Кислотнo-аддитивные соли включают соли, образованные из нетоксичных неорганических кислот, таких как хлористоводородная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, иодистоводородная, фосфористая и т.п., а также из нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксиалкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и т.п. Основно-аддитивные соли включают соли, образованные из щелочноземельных металлов, такие как натрий, калий, магний, кальций и т.п., а также из нетоксичных органических аминов, таких как N,N'-добензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т.п.

Фармацевтическая композиция, описанная здесь, может содержать также фармацевтический приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) растворимые в масле антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) образующие хелаты металлов агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях, описанных здесь, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и иньжецируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Подходящая текучесть может поддерживаться, например, применением материалов покрытий, таких как лецитин, поддержанием требуемого размера частиц в случае дисперсий и применением поверхностно-активных веществ.

Эти композиции могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, увлажняющие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предотвращение присутствия микроорганизмов может гарантироваться процедурами стерилизации, сурга, и включением различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. Может быть также желательным включение в композиции изотонических агентов, таких как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, пролонгированная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть осуществлена включением агентов, которые замедляют абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстемпорального приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области. За исключением случаев, когда какие-либо общепринятые среда или агент являются несовместимыми с активным соединением, рассматривается его применение в фармацевтических композициях, описанных в настоящем документе. В композиции могут быть также включены дополнительные активные соединения.

Как правило, фармацевтические композиции должны быть стерильными и стабильными в условиях приготовления и хранения. Композиция может быть приготовлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, пригодной для высокой концентрации лекарственного средства. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Необходимая текучесть может поддерживаться, например, с использованием покрытия, такого как лецитин, поддержанием требуемого размера частиц в случае дисперсии и использованием поверхностно-активных веществ. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть достигнута путем включения в композицию агента, который замедляет абсорбцию, например, моностеаратных солей и желатина.

Стерильные инъекционные растворы могут быть приготовлены путем включения  $^{18}\text{F}$ -меченого нацеливающего агента в требуемом количестве в подходящем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией путем микрофльтрации. Обычно дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит дисперсионную среду в качестве основы и требуемые другие ингредиенты из перечисленных выше ингредиентов. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов, предпочтительными способами приготовления являются сушка в вакууме и сушка вымораживанием (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента с любым дополнительным желаемым ингредиентом из его предварительно стерильно-отфильтрованного раствора.

Количество  $^{18}\text{F}$ -меченого нацеливающего агента, которое может быть объединено с материалом-носителем для изготовления стандартной лекарственной формы, будет варьироваться в зависимости от подлежащего лечению субъекта и конкретного способа введения. Количество  $^{18}\text{F}$ -меченого нацеливающего агента, которое может быть объединено с материалом-носителем для получения стандартной лекарственной формы, будет обычно количеством композиции, которое производит терапевтическое действие. Обычно, в расчете на сто процентов, это количество будет находиться в диапазоне приблизительно от 0,01% до приблизительно 99% активного ингредиента, предпочтительно приблизительно от 0,1% до приблизительно 70%, наиболее предпочтительно приблизительно от 1% до приблизительно 30% активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

#### VI. Введение и визуализация.

$^{18}\text{F}$ -меченые нацеливающие агенты, описанные здесь, являются полезными для различной *in vivo* визуализации (например, визуализации ткани или всего организма). В определенных вариантах осуществления  $^{18}\text{F}$ -меченый нацеливающий агент может быть использован для визуализации клеток или тканей, которые являются положительными в отношении мишени, например экспрессирующих мишень опухолей. Например,  $^{18}\text{F}$ -меченый нацеливающий агент вводят субъекту в количестве, достаточном для поглощения  $^{18}\text{F}$ -меченого нацеливающего агента в представляющей интерес ткани. Субъекта затем подвергают визуализации с помощью системы формирования изображений, такой как PET, в течение времени, соответствующего  $^{18}\text{F}$  радионуклиду.  $^{18}\text{F}$ -меченый нацеливающий агент, связанный с клетками или тканями, экспрессирующими нацеливающий агент, затем детектируют с помощью системы визуализации.

Как правило, в целях визуализации желательно обеспечить реципиента дозой белка или пептида, которая находится в диапазоне приблизительно от 1 до 200 мг в виде однократной внутривенной инфузии, хотя более низкие или более высокие дозы также можно вводить в зависимости от обстоятельств. Как правило, желательно обеспечить реципиента дозой, которая для типичного взрослого находится в диапазоне приблизительно от 1 до 10 мг белка или пептида на квадратный метр площади поверхности тела, хотя более низкие или более высокие дозы также можно вводить в зависимости от обстоятельств. Примеры доз белков или пептидов, которые можно вводить в организм субъекта-человека в целях визуализации, составляют приблизительно от 1 до 200 мг, приблизительно от 1 до 70 мг, приблизительно от 1

до 20 мг и примерно от 1 до 10 мг, хотя можно использовать более высокие или более низкие дозы.

В определенных вариантах осуществления введение меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка осуществляют в количестве, которое составляет примерно от 0,005 мкг/кг массы тела до 50 мкг/кг массы тела в сутки, как правило, от 0,02 мкг/кг массы тела до около 3 мкг/кг массы тела. Масса, связанная с ПЕТ-трейсером, находится в форме природного изотопа, а именно  $^{19}\text{F}$  для  $^{18}\text{F}$  ПЕТ-трейсера. Конкретная аналитическая доза для данной композиции включает примерно от 0,5 до 100 мкг меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка. Как правило, доза будет составлять примерно от 1 до 50 мкг меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка.

Схемы введения доз приспособливают для обеспечения оптимального детектируемого количества для получения четкого изображения ткани или клеток, которые поглощают  $^{18}\text{F}$ -меченый нацеливающий агент. Парентеральные композиции особенно предпочтительно составлять в единичных дозированных формах для легкости введения и однородности дозы. Используемая здесь единичная дозированная форма означает физически дискретные единицы, подходящие в качестве разовой дозы для субъектов, которым вводят  $^{18}\text{F}$ -меченый нацеливающий агент. Состав единичных дозированных форм, описанных здесь, продиктован и непосредственно зависит от:

- (a) уникальных характеристик нацеливающей части  $^{18}\text{F}$ -меченого нацеливающего агента;
- (b) ткани или клеток, подлежащих нацеливанию;
- (c) ограничений, присущих используемой системе визуализации.

Для введения  $^{18}\text{F}$ -меченого нацеливающего агента доза будет зависеть от типа заболевания, используемого нацеливающего соединения, возраста, физического состояния и пола субъекта, стадии заболевания, участка, подлежащего исследованию, и других факторов. В частности, достаточное внимание должно быть уделено дозам облучения пациента. Предпочтительно пациенту вводят насыщающую дозу  $^{18}\text{F}$ . Например, радиоактивная концентрация  $^{18}\text{F}$ -меченого нацеливающего агента обычно находится в диапазоне от 3,7 МБк до 3,7 ГБк, и предпочтительно от 18 до 740 МБк. Альтернативно, доза может измеряться, например, в милликюри. В некоторых вариантах осуществления количество  $^{18}\text{F}$ , вводимое в целях исследований визуализации, составляет от 5 до 10 мКи. В других вариантах осуществления эффективное количество будет представлять собой количество соединения, достаточное для получения активности в диапазоне приблизительно 1-5 мКи.

Фактические уровни доз активных ингредиентов в фармацевтических композициях, описанных здесь, могут варьироваться таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения желаемого поглощения  $^{18}\text{F}$ -меченого нацеливающего агента в клетках или тканях конкретного пациента, конкретной композиции и способа введения, без проявления токсичности в отношении данного пациента. Однако следует понимать, что общее ежедневное применение  $^{18}\text{F}$ -меченого нацеливающего агента согласно настоящему изобретению будет определяться лечащим терапевтом или другим лечащим врачом по результатам тщательной медицинской оценки. Конкретный уровень эффективной дозы для любого конкретного субъекта будет зависеть от различных факторов, включающих, например, активность конкретной используемой композиции; конкретную используемую композицию; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету хозяина; время введения; способ введения; скорость выведения конкретного используемого соединения; продолжительность лечения; другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными применяемыми композициями, возраст, пол, массу, заболевание, общее состояние здоровья и предыдущую историю болезни пациента, подлежащего лечению, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины. В определенных вариантах осуществления количество меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  зонда, вводимого субъекту-человеку, требуемое для визуализации, будет определяться лечащим врачом, при этом доза, как правило, будет варьироваться в соответствии с количеством испусканием из  $^{18}\text{F}$ -радионуклида.

Композиция, описанная здесь, может быть введена посредством одного или нескольких путей введения с помощью одного или нескольких из множества способов, известных в данной области. Как будет понятно специалисту в данной области, путь и/или способ введения будет варьироваться в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительные пути введения  $^{18}\text{F}$ -меченого нацеливающего агента, описанного здесь, включают внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например путем инъекции или инфузии. Используемые здесь выражение "парентеральное введение" означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и включает, но без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, внутриболоочечную, внутрикапсулярную, внутриглазную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, внутриспинальную, эпидуральную и надчревную инъекцию и инфузию. В определенных вариантах осуществления меченое радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  нацеливающее соединение вводят внутривенно.

Альтернативно,  $^{18}\text{F}$ -меченый нацеливающий агент, описанный здесь, можно вводить непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или путь введения через слизистую оболочку, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

В определенных вариантах осуществления  $^{18}\text{F}$ -меченый нацеливающий агент, описанный здесь, может быть составлен для гарантии надлежащего распределения *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) исключает многие высокогидрофильные соединения. Агенты могут пересекать BBB путем составления их, например, в липосомах. Способы изготовления липосом см., например, в патентах США 4522811; 5374548; и 5399331. Липосомы могут содержать один или несколько фрагментов, которые селективно транспортируются в специфические клетки или органы и, следовательно, усиливают нацеленную доставку лекарственного средства (см., например, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Иллюстративные нацеливающие фрагменты включают фолат или биотин (см., например, патент США 5416016, выданный Low et al.); маннозиды (Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); антитела (P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); рецептор белка А поверхностно-активного вещества (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); см. также K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994).

Следующая иллюстративная процедура может быть использована при проведении исследований методом PET-визуализации на пациентах в клинике. Пациенту предварительно вводят немеченый белок за некоторое время до дня проведения эксперимента и запрещают принимать пищу в течение по меньшей мере 12 ч, при этом разрешается прием воды без ограничений. Венозный катетер 20 G длиной два дюйма вставляют в контралатеральную локтевую вену для введения радиотрейсера в кровь.

Пациента помещают в PET-камеру и через внутривенный (i.v.) катетер вводят дозу PET-трейсера, представляющего собой зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка, такой как [ $^{18}\text{F}$ ]-меченое соединение из примера 9 (<20 мКи). Образцы артериальной или венозной крови берут через определенные промежутки времени на протяжении PET-сканирования для анализа и количественного определения доли в плазме крови неметаболизированного PET-трейсера, представляющего собой [ $^{18}\text{F}$ ]-меченое соединение из примера 2. Изображения получают в течение периода времени до 120 мин. Через десять минут после инъекции радиотрейсера и в конце сеанса визуализации берут образцы крови объемом 1 мл для определения концентрации в плазме крови любого немеченого белка, который мог быть введен до PET-трейсера.

Томографические изображения получают путем реконструкции изображения. Для определения распределения радиотрейсера области интереса (ROI) очерчивают на реконструированном изображении, включая, но без ограничения, легкие, печень, сердце, почки, кожу или другие органы и ткани. Поглощение радиотрейсера во времени в этих областях используют для создания кривых изменения активности во времени (ТАС), полученных без какого-либо вмешательства или в присутствии немеченого белка при различных исследуемых парадигмах дозирования. Данные представляют в виде радиоактивности на единицу времени на единицу объема (мКи/куб.см/мКи введенной дозы). Данные ТАС обрабатывают с помощью различных способов, хорошо известных в данной области, с получением количественных параметров, таких как потенциал связывания (BP) или объем распределения ( $V_T$ ), которые пропорциональны плотности незанятой ткани, положительной в отношении мишени.

#### VIII. Наборы и готовые изделия.

Также предлагаются наборы для изготовления меченых радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  нацеливающих композиций, описанных здесь, и инструкции по применению. Наборы обычно включают упакованную комбинацию реагентов в предварительно определенных количествах с инструкциями и этикеткой, указывающей предполагаемое применение содержимого набора. Термин "этикетка" включает любой письменный или аудио и видео материал, содержащийся на упаковке или поставляемый с набором, или который иным образом содержится в наборе.

Например, в некоторых вариантах осуществления набор содержит реагенты, необходимые для  $^{18}\text{F}$ -фторирования на месте протетической группы и последующего связывания радиоактивно меченой протетической группы с BFC-связанной нацеливающей молекулой (например, белком или пептидом) перед введением.

В определенных вариантах осуществления набор содержит один или несколько реагентов, необходимых для образования *in vivo*  $^{18}\text{F}$ -меченого визуализирующего агента анти-PD-L1 Аднектина, такого как PD-L1 Аднектин-PEG4-DBCO- $^{18}\text{F}$ , как описано здесь далее. Например, набор может включать первый флакон, содержащий анти-PD-L1 Аднектин-PEG-4-DBCO, и второй флакон, содержащий [ $^{18}\text{F}$ ]FPPEGA. Набор может включать первый флакон, содержащий анти-PD-L1 Аднектин-PEG-4-DBCO, второй флакон, содержащий 4-PEG-тозилазид, и третий флакон, содержащий  $^{18}\text{F}$  в  $\text{O}^{18}$ -воде. Кроме того, наборы могут включать флаконы, растворы и необязательно дополнительные реагенты, необходимые для изготовления PD-L1 Аднектин-PEG4-DBCO- $^{18}\text{F}$ .

В некоторых вариантах осуществления набор, кроме того, может включать по меньшей мере один дополнительный реагент (например, фармацевтически приемлемый носитель). В некоторых вариантах осуществления набор включает прекурсоры реакции, используемые для создания меченого зонда в соответствии с раскрытыми здесь способами. Компоненты набора могут быть адаптированы к конкретному биологическому состоянию, подлежащему мониторингу, как описано здесь. Кроме того, набор может включать подходящие буферы и реагенты, известные в данной области, для введения различных комби-

наций компонентов, перечисленных выше, в клетки-хозяева или организм-хозяин. Визуализирующий агент и носитель могут быть представлены в растворе или лиофилизированной форме. Когда визуализирующий агент и носитель набора находятся в лиофилизированной форме, набор может необязательно содержать стерильную и физиологически приемлемую среду для восстановления, такую как вода, физиологический раствор, забуференный физиологический раствор и т.п. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и пробирки. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Наборы могут дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши с инструкциями по применению.

#### IX. Применение.

В настоящем документе предлагаются способы визуализации с использованием  $^{18}\text{F}$ -меченых нацеливающих агентов. Трейсеры для позитронно-эмиссионной томографии (PET), такие как зонды на основе меченых радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белков согласно настоящему изобретению, можно применять в современной технологии PET для визуализации в исследовательских и диагностических целях *in vitro* и *in vivo*. Методы визуализации и оборудование для визуализации  $^{18}\text{F}$  путем PET-сканирования хорошо известны в данной области (см., например, патенты США № 6358489; 6953567; Page et al., Nuclear Medicine And Biology, 21:911-919, 1994; Choi et al., Cancer Research 55:5323-5329, 1995; Zalutsky et al., J. Nuclear Med., 33:575-582, 1992), и для PET-визуализации можно применять любой такой известный способ или прибор.

Применение методов визуализации *in vivo*, представленных здесь, включает диагностику заболеваний, мониторинг прогрессирования заболевания, прогноз, определение вероятности того, что субъект будет реагировать на лечение, определение пригодности для лечения, мониторинг клинического ответа на терапию, клиническую оценку и выбор дозы терапевтических соединений, доклинические исследования потенциальных лекарственных средств-кандидатов на животных моделях, и исследование регионального распределения и концентрации молекул-мишеней в тканях и органах. Применения *in vitro* включают скрининг лекарственных средств-кандидатов в клеточных анализах (например, конкурентных анализах, анализах аффинности и т.д.).

В некоторых вариантах осуществления  $^{18}\text{F}$ -меченые нацеливающие агенты можно применять для определения взаимосвязи между уровнем занятости ткани терапевтическими соединениями-кандидатами и клинической эффективностью у пациентов; определения доз для клинических испытаний лекарственных средств-кандидатов до инициирования долгосрочных клинических исследований; и сравнения активностей различных лекарственных средств-кандидатов.

В некоторых вариантах осуществления меченое радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  нацеливающее соединение применяют в способе для визуализации *in vivo* нормальных или пораженных заболеванием тканей и/или органов (например, легких, сердца, почек, печени и кожи). Например, меченое радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  нацеливающее соединение вводят субъекту в количестве, эффективном для достижения поглощения меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  нацеливающего соединения в представляющих интерес клетках или ткани. Затем субъекта помещают в соответствующую систему визуализации (например, PET-систему) на период времени, достаточный для детекции меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  нацеливающего соединения. Локализация детектированного сигнала от меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  нацеливающего соединения может коррелировать с локализацией представляющих интерес клеток или ткани. В некоторых вариантах осуществления могут быть также определены размеры локализации. Визуализация *in vivo* описана в настоящем документе. См. также патенты США 6126916; 6077499; 6010680; 5776095; 5776094; 5776093; 5772981; 5753206; 5746996; 5697902; 5328679; 5128119; 5101827; и 4735210, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки.

Таким образом, в определенных аспектах предлагается способ получения изображения зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка, при этом способ включает введение зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка субъекту и визуализацию *in vivo* распределения зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка с помощью PET.

В определенных вариантах осуществления субъектом является млекопитающее, например человек, собака, кошка, примат, обезьяны, крыса или мышь.

В определенных аспектах предлагается способ диагностики присутствия заболевания у субъекта, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка, который связывается с молекулой-мишенью, ассоциированной с присутствием заболевания, и получение радиоизображения по меньшей мере части субъекта для детекции присутствия или отсутствия зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка.

В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой солидный рак, гемопоэтический рак, гематологический рак, аутоиммунное заболевание, нейродегенеративное заболевание, сердечно-сосудистое заболевание или патогенную инфекцию.

PET-визуализацию с использованием меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  нацеливающего соединения можно использовать для качественной или количественной детекции нацеливающего соединения. Визуализирующий агент - меченое радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  нацеливающее соединение можно ис-

пользовать в качестве биомаркера, и присутствие или отсутствие положительного сигнала у субъекта может например, свидетельствовать на то, будет ли субъект отвечать на назначенную терапию, например, терапию рака, или о том, отвечает или не отвечает субъект на терапию.

В некоторых вариантах осуществления стадии этого способа могут повторяться через определенные интервалы времени, поэтому локализацию и/или размер заболевания можно контролировать как функцию времени и/или лечения. В некоторых вариантах осуществления меченое радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  нацеливающее соединение можно применять у субъекта, подвергающегося лечению (например, химиотерапии, и т.д.), для содействия визуализации ответа на лечение. Например, меченое радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  нацеливающее соединение обычно визуализируют и определяют размер до лечения и периодически (например, ежедневно, еженедельно, ежемесячно, в интервалах между ними, и т.п.) в ходе лечения для мониторинга прогрессирования или регрессии заболевания у пациента.

Таким образом, в определенных аспектах предлагается способ мониторинга прогрессирования заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение субъекту зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка, который связывается с молекулой-мишенью, ассоциированной с присутствием заболевания, в первый момент времени и получение изображения по меньшей мере части субъекта для определения количества пораженных заболеванием клеток или ткани, и введение субъекту зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка в один или несколько последующих моментов времени и получение изображения по меньшей мере части субъекта в каждый последующий момент времени (например, той же части субъекта, что и в первый момент времени).

В определенных вариантах осуществления, размер опухоли можно наблюдать у субъекта, подвергающегося терапии против рака (например, химиотерапии, лучевой терапии), и степень регрессии опухоли можно наблюдать в режиме реального времени путем детекции нацеленного на опухоль зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные здесь, применяют для оценки ответа пациента на терапию. В некоторых вариантах осуществления способы применяют для выбора или изменения дозы терапевтических соединений. В некоторых вариантах осуществления способы применяют для мониторинга поглощения меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  нацеливающего соединения в нормальных тканях для анализа токсичности или отклонения между пациентами. В некоторых вариантах осуществления способы применяют для мониторинга эффективности лекарственного средства или для определения резистентности к лекарственному средству.

В некоторых вариантах осуществления радиоактивно меченые соединения вводят млекопитающим, предпочтительно человеку, в виде фармацевтической композиции отдельно или в сочетании с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями в соответствии со стандартной фармацевтической практикой. Такие композиции можно вводить перорально или парентерально, включая внутривенный, внутримышечный, внутрибрюшинный, подкожный, ректальный и местный пути введения. В определенных вариантах осуществления введение представляет собой внутривенное введение. В определенных вариантах осуществления радиоактивно меченое соединение вводят путем внутривенной инъекции в течение менее одного часа после синтеза.

В некоторых вариантах осуществления биологическая активность меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  нацеливающего агента *in vivo* может быть измерена в отношении специфического поглощения в органах путем исследований биораспределения и динамических ПЕТ-исследований мелких животных в соответствующей животной модели. Например, для исследований биораспределения группе животных инъецировали меченый радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  нацеливающий агент и подгруппы животных умерщвляли через один или несколько интервалов времени (например, через 5, 10, 30, 60 мин, 2 ч). Представляющие интерес органы и ткани быстро извлекали и взвешивали, и определяли радиоактивность. Накопленную радиоактивность в органах и выбранных тканях рассчитывали в виде процента от введенной дозы (% ID).

В некоторых вариантах осуществления меченый радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  нацеливающий агент, обеспеченный в настоящем документе, используют *in vitro* в качестве скринингового инструмента для отбора соединений для лечения тканей или клеток. Например, в некоторых вариантах осуществления пораженные заболеванием клетки инкубировали с меченым радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  нацеливающим соединением во время или после подвергания воздействию одного или нескольких лекарственных средств-кандидатов. Способность лекарственного средства-кандидата воздействовать на заболевание можно визуализировать во времени с использованием меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  нацеливающего соединения.

Например, целостность биологической активности меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  нацеливающего агента *in vitro* в отношении специфического связывания с выбранной молекулой-мишенью и поглощения радиоактивно меченой композиции оценивали в клеточной линии, экспрессирующей молекулу-мишень. Для анализов связывания и клеточной ассоциации клетки инкубировали при 4 или 37°C в течение надлежащего периода времени с меченой радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  нацеливающей композицией. Неспецифическое связывание определяли путем добавления избытка немеченого нацеливающего агента. Степень специфического связывания рассчитывали путем вычитания неспецифического связыва-

ния из общего связывания. Поглощение выражали в виде процента от общей добавленной дозы нацеливания агента к клеткам на микрограмм белка (% ID/мкг клеточного белка).

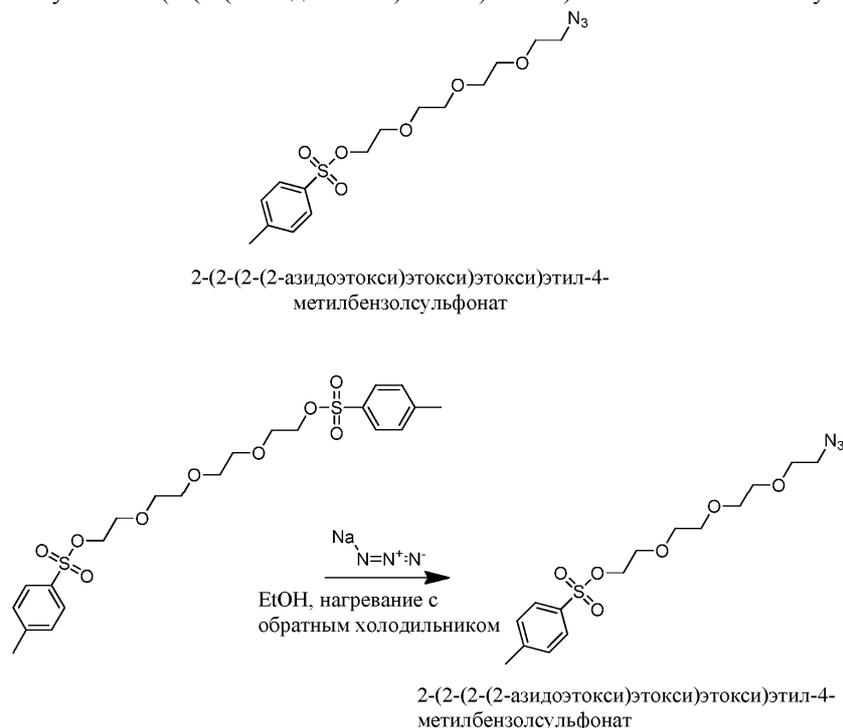
В родственном аспекте в настоящем изобретении предлагается диагностическая или радиофармацевтическая композиция для *in vivo* или *in vitro*, которая включает зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка, и фармацевтический приемлемый носитель.

Включение путем отсылки.

Все документы и ссылки, включая патентные документы и веб-сайты, описанные здесь, индивидуально включены в виде ссылки в настоящий документ в той же степени, как если бы они были представлены в данном документе полностью или частично.

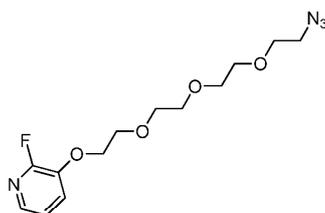
Настоящее изобретение будет описано со ссылкой на следующие примеры, которые являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Хотя изобретение описано подробно и со ссылкой на конкретные варианты его осуществления, специалисту в данной области будет очевидно, что различные изменения и модификации могут быть сделаны без отступления от сущности и объема изобретения.

Пример 1. Получение 2-(2-(2-(2-азидоэтокс)этокс)этокс)этил-4-метилбензолсульфоната

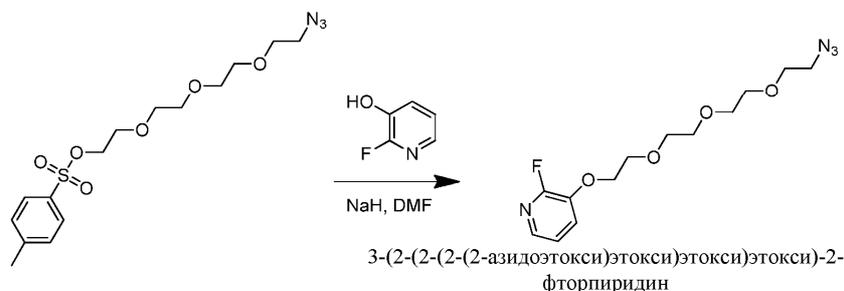


Смесь ((оксидис(этан-2,1-диил))бис(окси))бис(этан-2,1-диил)бис(4-метилбензолсульфоната) (5 г, 9,95 ммоль) и азид натрия (0,647 г, 9,95 ммоль) растворяли в этаноле (50 мл) и реакционную смесь нагревали с обратным холодильником при 90°C в течение 17 ч. Растворитель удаляли в частичном вакууме, а затем наносили на картридж, заполненный 40 г силикагеля, и очищали флэш-хроматографией (Isco-CombiFlash - элюировали линейным градиентом от 10% этилацетата в гексанах до 90% этилацетата в гексанах в течение 45 мин). Объединенные фракции анализировали с помощью тонкослойной хроматографии (TLC) и объединяли с получением 2-(2-(2-(2-азидоэтокс)этокс)этокс)этил-4-метилбензолсульфоната в виде бесцветного масла. Вследствие реакционной природы 2-(2-(2-(2-азидоэтокс)этокс)этокс)этил-4-метилбензолсульфоната этот продукт использовали "как есть" без какой-либо дополнительной обработки.

Пример 2. Получение 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокс)этокс)этокс)этокс)этил-2-фторпиридина



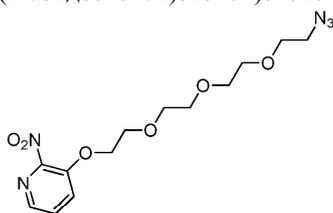
3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридин



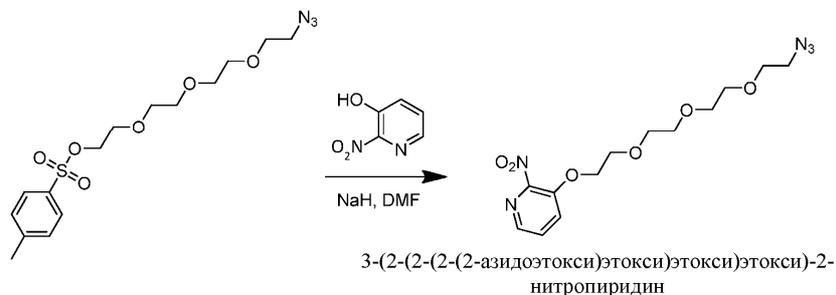
3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридин

К суспензии гидрида натрия (0,129 г, 3,21 ммоль) в DMF (10 мл) при 0°C по каплям добавляли перемешиваемый раствор 2-фторпиридин-3-ола (0,363 г, 3,21 ммоль) в DMF (5 мл), затем по каплям добавляли раствор 2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этил-4-метилбензолсульфоната (1,00 г, 2,68 ммоль) в DMF (5 мл). Суспензию выдерживали при 0°C в течение 10 мин, затем доводили до комнатной температуры в течение 1 ч с последующим нагреванием при температуре 60°C в течение 4 ч. Растворитель удаляли в вакууме. Добавляли 100 мл этилацетата с последующими 3 отдельными экстракциями путем промывки концентрированным солевым раствором. Органический слой сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Сырой продукт очищали флэш-хроматографией (IscoCombiFlash - элюировали 10-50% EtOAc в гексане) с получением бесцветного масла. 3-(2-(2-(2-(2-Азидоэтокси)этокси)этокси)-2-фторпиридин (702 мг, 2,233 ммоль, выход 83%) выделяли в виде прозрачного масла. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 7.75 (дт, J=4.9, 1.6 Гц, 1H), 7.33 (ддд, J=10.0, 8.1, 1.5 Гц, 1H), 7.10 (ддд, J=7.9, 4.9, 0.7 Гц, 1H), 4.30 - 4.16 (м, 2H), 3.95 - 3.83 (м, 2H), 3.80 - 3.61 (м, 10H), 3.38 (т, J=5.1 Гц, 2H) <sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, хлороформ-d) δ 142.3, 137.7, 137.5, 123.4, 123.4, 121.7, 121.6, 77.3, 76.7, 70.9, 70.7, 70.6, 70.0, 69.4, 69.0, 50.6 <sup>19</sup>F ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ -83.55. HRMS (ESI) теоретически: C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> m/z 315.464; найдено 315.1463.

Пример 3. Получение 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-нитропиридина



3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-нитропиридин

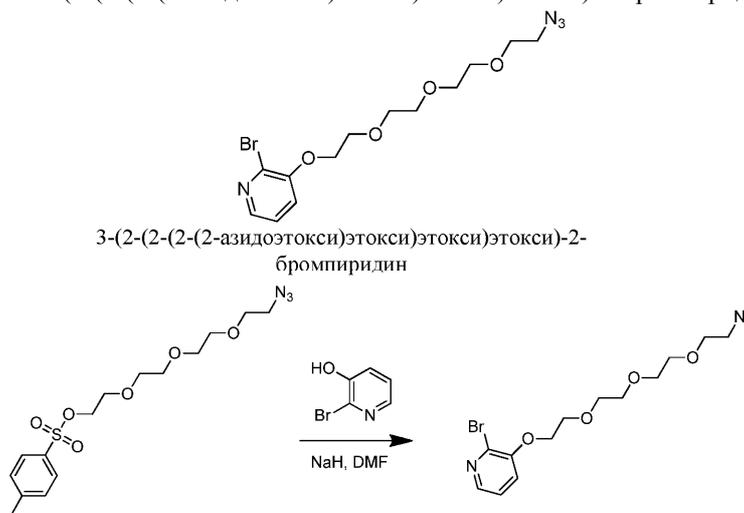


3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-нитропиридин

Гидрид натрия (0,121 г, 3,01 ммоль) (60% суспензия в масле) растворяли в DMF (7,0 мл) и полученную суспензию охлаждали до 0°C. Медленно добавляли раствор 2-нитропиридин-3-ола (0,384 г, 2,74 ммоль) в DMF (1,5 мл) с последующим добавлением по каплям 2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этил-4-метилбензолсульфоната (1,023 г, 2,74 ммоль) в DMF (1,5 мл). Суспензию выдерживали при 0°C в течение 10 мин, затем доводили до комнатной температуры в течение 2 ч с последующим нагреванием до 60°C в течение 72 ч. Реакцию гасили 10 мл деионизированной воды, а затем экстрагирова-

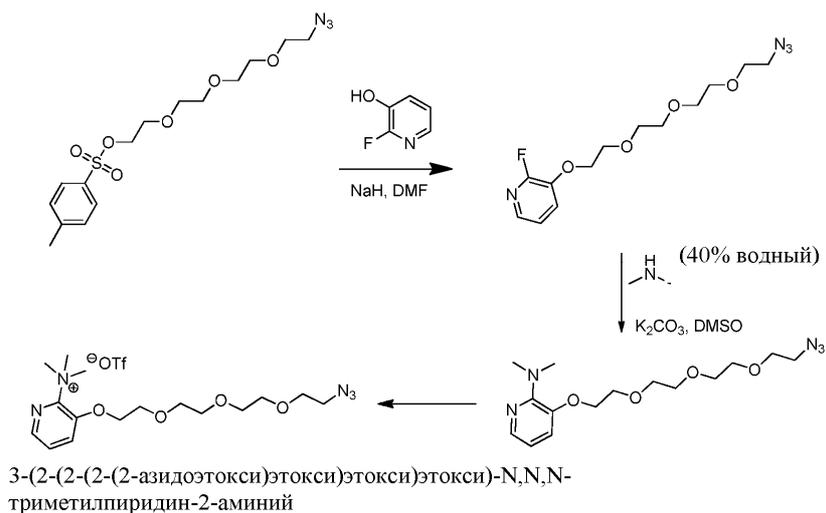
ли этилацетатом (3×10 мл). Объединенные экстракты EtOAc промывали концентрированным соевым раствором (10 мл), сушили над сульфатом натрия, фильтровали и выпаривали при пониженном давлении с получением светло-желтого масла. Сырой продукт очищали флэш-хроматографией. Картридж, заполненный 24 г силикагеля, 25 мл/мин, начиная от 10% этилацетата в гексанах с последующим линейным изменением до 50% этилацетата в гексанах в течение 25 мин. После этого градиент сохраняли при этом составе растворителей в течение 10 мин, затем изменяли на 100% этилацетата в течение 10 мин. 3-(2-(2-(2-(2-Азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-нитропиридин элюировали на участке хроматограммы между 30-40 мин и объединенные фракции выпаривали при пониженном давлении, затем под вакуумом в течение 2 ч с получением 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-нитропиридина (687 мг, 1,973 ммоль, выход 72,0%) в виде светло-желтого масла.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, хлороформ-d)  $\delta$  8.11 (дт,  $J=4.9, 1.6$  Гц, 1H), 7.60 (ддд,  $J=10.0, 8.1, 1.5$  Гц, 1H), 7.52 (ддд,  $J=7.9, 4.9, 0.7$  Гц, 1H), 4.30 - 4.16 (м, 2H), 3.95 - 3.83 (м, 2H), 3.80 - 3.61 (м, 10H), 3.38 (т,  $J=5.1$  Гц, 2H)  $^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц, хлороформ-d)  $\delta$  147.3, 139.5, 128.4, 124.4, 71.1, 70.7, 70.6, 70.0, 69.9, 69.3, 50.7. HRMS (ESI) теоретически:  $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_6$   $m/z$  342.1408; найдено 342.1409.

Пример 4. Синтез 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-бромпиридина

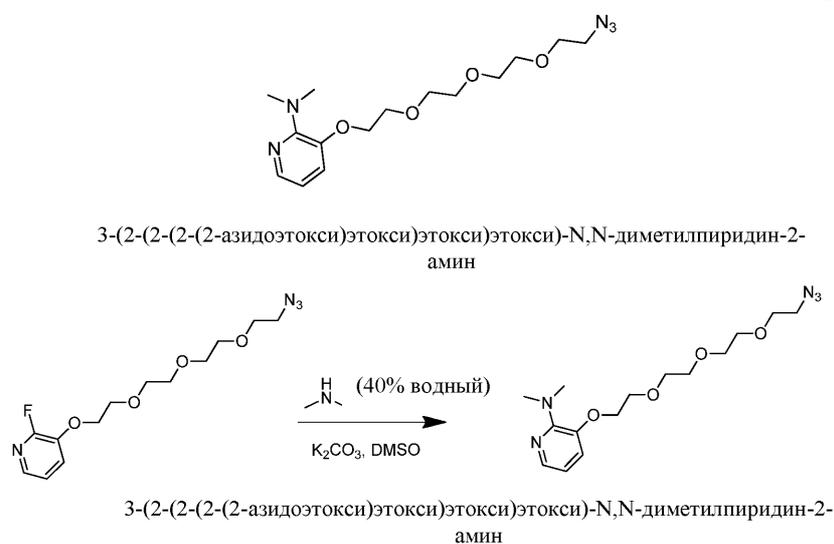


К суспензии гидрида натрия (NaH, 25,7 мг, 0,643 ммоль) в диметилформамиде (DMF, 5 мл) при 0°C по каплям добавляли раствор 2-бромпиридин-3-ола (112 мг, 0,643 ммоль) в DMF (1 мл) с последующим добавлением по каплям раствора 2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этил-4-метилбензолсульфона (200 мг, 0,536 ммоль) в DMF (1 мл). Суспензию выдерживали при 0°C в течение 10 мин, затем доводили до комнатной температуры и выдерживали в течение 1 ч с последующим нагреванием до 60°C в течение 4 ч. После завершения нагревания растворитель сырой реакционной смеси удаляли в вакууме. Сырую реакционную смесь восстанавливали в 50 мл этилацетата, промывали 2×50 мл водного солевого раствора и органический слой сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. Сырой продукт реакции очищали обращенно-фазовой HPLC с получением 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-бромпиридина, TFA (112 мг, 0,229 ммоль, выход 42,7%) в виде светло-желтого масла. HRMS ESI  $m/z$  (M+H), теоретически  $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{BrN}_4\text{O}_4$  375.0664 найдено 375.0662;  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7.97 (дд,  $J=4.6, 1.5$  Гц, 1H), 7.54 (дд,  $J=8.2, 1.6$  Гц, 1H), 7.40 (дд,  $J=8.1, 4.6$  Гц, 1H), 4.24 (дд,  $J=5.3, 3.9$  Гц, 2H), 3.85 - 3.78 (м, 2H), 3.68 - 3.62 (м, 2H), 3.62 - 3.52 (м, 8H), 3.42 - 3.34 (м, 2H).

Пример 5. Схема синтеза соединения триметиланилина

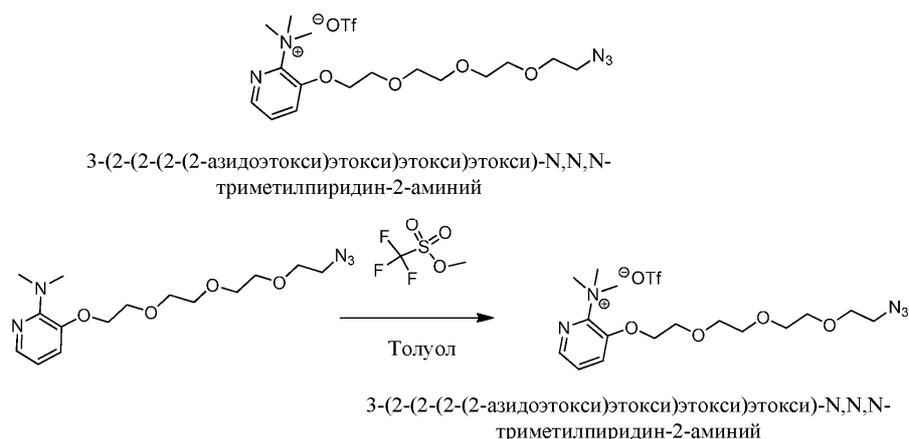


Пример 6. Синтез 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтоксид)этоксид)этоксид)этоксид)-N,N-диметилпиридин-2-амина



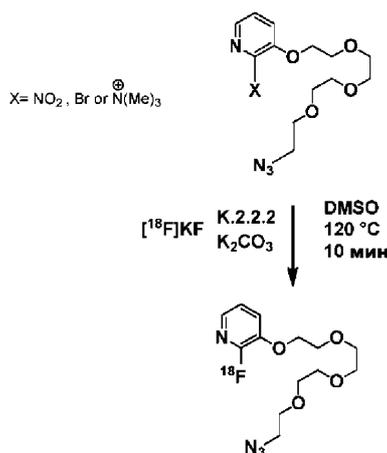
Смесь 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтоксид)этоксид)этоксид)этоксид)-2-фторпиридина (160 мг, 0,509 ммоль), карбоната калия ( $K_2CO_3$ , 84 мг, 0,611 ммоль) и диметиламина (40% в воде, 0,097 мл, 0,764 ммоль) в диметилсульфоксиде (DMSO, 2,5 мл) нагревали в герметичном сосуде под давлением при 110°C в течение 14 ч. После завершения нагревания растворитель сырой реакционной смеси удаляли в вакууме. Сырую реакционную смесь восстанавливали в 50 мл этилацетата, промывали 2×50 мл водного солевого раствора и органический слой сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали в вакууме. Сырую реакционную смесь очищали нормально-фазовой хроматографией с получением 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтоксид)этоксид)этоксид)этоксид)-N,N-диметилпиридин-2-амина (140 мг, 0,413 ммоль, 81% выход) в виде бесцветного масла.  $^1H$  ЯМР (400 МГц, хлороформ-d)  $\delta$  7.86 (дд,  $J=4.9, 1.5$  Гц, 1H), 7.02 (дд,  $J=7.8, 1.5$  Гц, 1H), 6.73 (дд,  $J=7.8, 4.9$  Гц, 1H), 4.20 - 4.07 (м, 2H), 3.98 - 3.86 (м, 2H), 3.81 - 3.61 (м, 9H), 3.38 (т,  $J=5.1$  Гц, 2H), 3.13 - 2.94 (м, 6H), 1.69 (с, 2H). HRMS (ESI) теоретически:  $C_{15}H_{26}N_5O_4^+$   $m/z$  340.1980; найдено 340.1979.

Пример 7. Синтез 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтоксид)этоксид)этоксид)этоксид)-N,N,N-триметилпиридин-2-аминия



Метил трифторметансульфонат (0,065 мл, 0,589 ммоль) добавляли к раствору 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-N,N-диметилпиридин-2-амина (40 мг, 0,118 ммоль) в толуоле (1,5 мл) в герметичном контейнере при постоянном потоке азота. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 14 ч. Растворитель удаляли и полученный остаток промывали 2×10 мл эфира, азеотропно сушили в 2×1 мл дихлорметана и сушили под вакуумом при высоком давлении в течение ночи с получением 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-N,N,N-триметилпиридин-2-аминия, трифторметансульфоната с количественным выходом в виде густого бесцветного масла. LCMS  $m/z$  354.33;  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  8.24 - 8.17 (м, 1H), 7.98 (д,  $J=8.3$  Гц, 1H), 7.75 (ддд,  $J=8.2, 4.6, 3.2$  Гц, 1H), 4.44 (уш.с, 2H), 3.88 (д,  $J=3.9$  Гц, 2H), 3.69 - 3.45 (м, 21H).

Пример 8. Синтез  $^{18}\text{F}$ -3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина с использованием 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-N,N,N-триметилпиридин-2-аминия, трифторметансульфонатной соли



Синтез  $^{18}\text{F}$ -3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина.

Водный раствор  $^{18}\text{F}$ -фторида (2,0 мл, 33,3 ГБк/900 мКи) получали от фирмы P.E.T. Net® Pharmaceuticals, West Point PA и напрямую переносили в картридж Sep-Pak light QMA [перед использованием картридж Sep-Pak light QMA предварительно последовательно кондиционировали 5 мл 0,5М бикарбоната калия, 5 мл деионизированной воды и 5 мл MeCN.] После переноса водный раствор  $^{18}\text{F}$ -фторида высвобождали из QMA Sep-Pak путем последовательного добавления карбоната калия (15 мг/мл; 0,1 мл) с последующей смесью карбоната калия (30 мг/мл, 0,1 мл), 4,7,13,16,21,24-гексаокса-1,10-дизабицикло[8.8.8]гесакозана (15 мг, 0,04 ммоль) и 1,2 мл MeCN. Растворитель выпаривали в слабом потоке азота при 90°C и вакууме. Азеотропную сушку повторяли дважды с использованием 1 мл порций ацетонитрила с получением безводного комплекса K.2.2.2/[ $^{18}\text{F}$ ]F. 3-(2-(2-(2-(2-Азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-N,N,N-триметилпиридин-2-аминий, трифторметансульфонатную соль (2 мг, 5,6 мкмоль) растворяли в 500 мкл DMSO и добавляли к высушенному криптану. Этот раствор нагревали при 120°C в течение 10 мин. После этого сырую реакционную смесь разбавляли 3 мл деионизированной воды. Затем все содержимое сырой реакционной смеси переносили, нагружали и очищали с использованием обращенно-фазовой HPLC и следующих условий: колонка HPLC: Luna C18, 250×10 мм, растворитель A: 0,1% TFA в деионизированной (DI) воде; растворитель B: 0,1% TFA в ацетонитриле при скорости потока 4,6 мл/мин с использованием изократического режима 32% B, и УФ-детекции при 280 нм.  $^{18}\text{F}$ -3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридин изолировали на отметке 24 мин на хроматограмме и собирали в течение 2 мин. Этот продукт собирали в колбу емкостью 100 мл, которая содержала 10 мл деионизированной (DI) воды, и все содержимое наносили на картридж для твердофазной экстракции

Sep-Pak Vac tC18 6 cc 1g sep pack от Waters. В результате этой реакции выделяли 6.1 Гбк/164 мКи [ $^{18}\text{F}$ ]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина. Высвобождение из Sep-Pak проводили с использованием 3 мл этанола и этот раствор восстанавливали с помощью теплового источника при 98°C, слабого потока азота и вакуума в течение 15 мин до тех пор, пока в этой колбе не оставалась только пленка. Конечный продукт, который восстанавливали в 100% буфере 1× PBS, оставался стабильным в этой среде в течение более 1 ч при 37°C.

[ $^{18}\text{F}$ ]-3-(2-(2-(2-(2-Азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридин можно использовать для получения  $^{18}\text{F}$ -меченых биологических продуктов, используя преимущества "клик" азид-алкиновой реакции с соответствующим биологическим препаратом, содержащим алкины.

Пример 9. Получение меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка с использованием "клик-химии".

В этом примере [ $^{18}\text{F}$ ]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридин использовали для радиоактивного мечения белка-мишени, как показано на фиг. 1 и 5.

А. Фторирование предшественника 4-PEG-тозилазида с образованием [ $^{18}\text{F}$ ]-FPPEGA.

$^{18}\text{F}$  в  $^{18}\text{O}$ -воде (3 мл) с активностью 900 мКи (получен от IBA Molecular) переносили напрямую в микроколбу (без QMA), которая содержала 4,7,13,16,21,24-гексаокса-1,10-диазабицикло[8.8.8]гексакозан (2,8 мг, 7,44 мкмоль) и карбонат калия (1,7 мг, 0,012 ммоль). В эту сырую реакционную смесь переносили дополнительно 2,0 мл ацетонитрила и подвергали азеотропной сушке. Этот процесс завершали выпариванием раствора с использованием масляной бани при 98°C и применением слабого потока  $\text{N}_2$  и частичного вакуума. Объем раствора сокращали примерно до 2 мл. Добавляли дополнительно 2 мл ацетонитрила и процесс повторяли 3 раза в течение 40 мин. После сокращения объема жидкости до менее 0,3 мл добавляли аликвоту 0,7 мл ацетонитрила и объем раствора сокращали путем последующей азеотропной перегонки до достижения ~ 0,1 мл. Добавляли дополнительно 0,9 мл ацетонитрила и этот процесс завершали после образования твердого вещества белого цвета. Этот процесс занял ~ 55 мин. Во время заключительной процедуры колбу удаляли с масляной бани до превращения раствора в сухое состояние и остаток в колбе помещали в полный вакуум (без потока  $\text{N}_2$ ) при комнатной температуре на 20 мин. Общее время, которое потребовалось для переноса и сушки смеси [ $^{18}\text{F}$ ]-FPPEGA криптанда, составило 65 мин.

В высушенную смесь [ $^{18}\text{F}$ ]-FPPEGA криптанда добавляли 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-нитропиридин (2 мг, 5,86 мкмоль), растворенный в 500 мкл DMSO, и эту смесь нагревали при 120°C в течение 10 мин. По истечении этого времени сырую реакционную смесь разбавляли 3 мл деионизированной воды, а затем все содержимое переносили и наносили на колонку HPLC при следующих условиях: колонка HPLC: Luna C18 250×10 мм; растворитель А: 0,1% TFA в деионизированной (DI) воде; растворитель В: 0,1% TFA в ацетонитриле; скорость потока 4,6 мл/мин; давление 1820 PSI; изократический режим 32% В; УФ-детекция при 280 нм. Продукт [ $^{18}\text{F}$ ]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридин ([ $^{18}\text{F}$ ]-FPPEGA) изолировали на отметке 24 мин из хроматограммы и собирали в течение 2 мин. Этот продукт собирали в колбу емкостью 100 мл, которая содержала 15 мл деионизированной воды, и все содержимое наносили на картридж Sep Pak Vac tC18 6 cc 1g sep pack. PN WAT036795. [ $^{18}\text{F}$ ]-FPPEGA высвобождали из Sep Pak с помощью 2,5 мл этанола и полученный раствор концентрировали в течение 15 мин до сухого состояния при 98°C в атмосфере  $\text{N}_2$  и вакууме. Полученное соединение растворяли в 0,1 мл 1×PBS (фосфатно-буферный солевой раствор). Этот продукт анализировали с использованием колонки Varian HPLC Luna C18 (2) 4,6×150 мм, растворитель А: 0,1% TFA в деионизированной воде; растворитель В: 0,1% TFA в ацетонитриле; скорость потока 1,0 мл/мин; градиентный режим 0 мин 90% А 10% В; 15 мин 30% А 70% В; 17 мин 30% А 70% В; 18 мин 90% А 10% В; 20 мин 90% А 10% В; УФ-детекция при 280 нм. Изолировали 220 мКи [ $^{18}\text{F}$ ]-FPPEGA.

В. Получение E01-4PEG-DBCO.

Использовали белок FBS E01 Аднектин, имеющий следующую аминокислотную последовательность:

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRAQLSPSFYYRITYGETGGNSPVQEFT

VPNDVMTATISGLKPGVDYITVYAVTTHTGVYFYSIPISINYRTPC (E01; SEQ ID NO:1),

содержащую С-концевые аминокислоты PC.

Поскольку малеимидную химию использовали для связывания нацеливающего белка с PEG4-DBCO, E01 Аднектин сначала модифицировали путем добавления пролина с последующим цистеином на его С-конце с использованием обычных рекомбинантных методов. Малеймид-PEG4-DBCO (Click Chemistry Tools) в 4-кратном молярном избытке растворяли в DMSO и добавляли к очищенному модифицированному E01 Аднектину в присутствии 1 mM TCEP. Конечные концентрации DMSO не превышали 5% в конъюгируемых смесях. Конъюгируемую смесь оставляли при комнатной температуре на один час перед проведением масс-спектрометрического анализа. После подтверждения конъюгирования с помощью MS анализа образец очищали эксклюзионной хроматографией, используя колонку HiLoad 26/60 Superdex 75 (GE Healthcare), уравновешенную PBS, pH 7,2.

С. Связывание [ $^{18}\text{F}$ ]-FPPEGA с Аднектином.

0,2 мл 5,4 мг/мл раствора Аднектина E01-4PEG-DBCO (приготовленного, как описано в разделе В) инкубировали с 200 мКи 0,1 мл [ $^{18}\text{F}$ ]-FPPEGA (пример 1) в буфере 1×PBS. Раствор осторожно перемешивали.

вали путем пипетирования несколько раз вверх и вниз сырой реакционной смеси и инкубировали вместе в течение 45 мин при 45°C или при комнатной температуре. Содержимое этой сырой реакционной смеси очищали эксклюзионной хроматографией (SEC) на колонке Superdex 200 при скорости потока 0,5 мл/мин, буфер 1×PBS и продукт [<sup>18</sup>F]-E01-4PEG-DBCO-FPPEGA изолировали на отметке 37 мин на хроматограмме в течение 2 мин.

[<sup>18</sup>F]-E01-4PEG-DBCO-FPPEGA анализировали с помощью SEC с совместной инъекцией нерадиоактивного стандартного образца, RP-HPLC (обращенно-фазовой HPLC) на колонке, заполненной носителем PLRP-S, и гель-электрофореза.

Эксклюзионную хроматографию (SEC) выполняли с использованием следующих параметров:

колонка Superdex 200;

растворитель 100% буфер 1X PBS;

скорость потока 0,5 мл/мин;

УФ-детекция при 280 нм;

обращенно-фазовая HPLC;

колонка: носитель PLRP-S размером 8 мкм, 1000Å, 4,6×250 мм;

растворитель А: 0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизированной воде;

растворитель В: ацетонитрил;

скорость потока: 1 мл/мин;

давление: 1351 PSI;

градиент:

0 мин 90% А 10% В;

30 мин 45% А 55% В;

32 мин 25% А 75% В;

36 мин 25% А 75% В;

50 мин 90% А 10% В.

15 мКи [<sup>18</sup>F]-E01-4PEG-DBCO-FPPEGA выделяли с радиохимической чистотой (RCP) > 99% посредством расчетов SEC и RP HPLC и с удельной радиоактивностью 0,6 мКи/нмоль при проведении реакции при 45°C. При проведении реакции при комнатной температуре получали 5,72 мКи. Удельная радиоактивность [<sup>18</sup>F]-FPPEGA составила 0,512 мКи/нмоль и радиохимическая чистота (RCP) составила 85,7% через 3 ч после завершения его синтеза при проведении реакции при температуре 45°C или при комнатной температуре соответственно. Удельную радиоактивность измеряли на NanoDrop (см <http://www.nanodrop.com>). Продукт совместно элюировали с нерадиоактивным стандартным образцом на SEC и PLRP-S. Гель-электрофорез подтвердил, что <sup>18</sup>F продукт соответствует молекулярной массе стандарта 11 кДа.

Меченое радиоактивным изотопом <sup>18</sup>F соединение E01-4PEG-DBCO можно применять в различных способах визуализации *in vitro* и/или *in vivo*, включая диагностическую визуализацию, фундаментальные исследования и радиотерапию. Конкретные примеры возможного применения в диагностической визуализации и радиотерапии включают определение локализации, относительной активности и/или количественную оценку PD-L1-положительных опухолей, радиоиммуноанализ PD-L1-положительных опухолей и радиоавтографию для определения распределения PD-L1-положительных опухолей у млекопитающих или в полученных от них образцах органов или тканей.

В частности, меченое радиоактивным изотопом <sup>18</sup>F соединение E01-4PEG-DBCO является полезным для визуализации методом позитронно-эмиссионной томографии (PET) PD-L1-положительных опухолей в легких, сердце, почках, печени и коже, а также других органах человека и экспериментальных животных. PET-визуализацию с использованием меченого радиоактивным изотопом <sup>18</sup>F соединения E01-4PEG-DBCO можно применять для получения следующей информации: взаимосвязи между уровнем занятости ткани лекарственными средствами-кандидатами, предназначенными для лечения PD-L1-опухолей, и клинической эффективностью у пациентов; выбора дозы для клинических испытаний лекарственных средств, предназначенных для лечения PD-L1-опухолей, до инициации долгосрочных клинических исследований; сравнительных активностей структурно новых лекарственных средств, предназначенных для лечения PD-L1-опухолей; изучения влияния лекарственных средств, предназначенных для лечения PD-L1-опухолей, на *in vivo* аффинность переносчика и плотность во время лечения клинических мишеней лекарственными средствами, предназначенными для лечения PD-L1-опухолей; изменений плотности и распределения PD-L1-положительных опухолей во время эффективного и неэффективного лечения.

Например, ингибирование PD-L1 может быть рассчитано исходя из изменения BP или Vt с помощью анализа равновесия в присутствии лекарственного средства, предназначенного для лечения PD-L1-опухолей, при различных парадигмах дозирования по сравнению с BP или Vt в не подвергнутом лечению состоянии. Кривые ингибирования создавали путем нанесения вышеуказанных данных против дозы (концентрации) лекарственного средства, предназначенного для лечения PD-L1-опухолей. Затем рассчи-

тывали ингибирование PD-L1-положительных опухолей исходя из максимального уменьшения  $V_T$  или BP PET-радиолигандов, достигаемого с помощью блокирующего лекарственного средства при  $E_{max}$ ,  $T_{max}$  или  $T_{min}$ , и исходя из изменения их неспецифического объема распределения ( $V_{ND}$ ) и BP в присутствии лекарственных средств, предназначенных для лечения PD-L1-опухолей, при различных парадигмах дозирования, по сравнению с BP или  $V_T$  в не подвергнутом лечению состоянии. Значения  $ID_{50}$  получали путем аппроксимации кривых зависимости ингибирования от мощности дозы.

Пример 10. Дифференциация *in vitro* PD-L1-положительных клеток от PD-L1-отрицательных клеток с помощью визуализирующего агента анти-PD-L1 Аднектина.

В этом эксперименте меченый радиоактивным изотопом  $^{18}F$  E01-4PEG-DBCO тестировали на его способность проводить различие между PD-L1-положительными клетками и PD-L1-отрицательными клетками *in vitro*.

$1 \times 10^6$  PD-L1-положительных клеток карциномы легкого человека L2987 или PD-L1-отрицательных клеток колоректальной аденокарциномы человека HT-29 помещали в культуральные пробирки объемом 5 мл ( $n = 3$  пробирки на заболевание). Раствор меченого радиоактивным изотопом  $^{18}F$  E01-4PEG-DBCO готовили в PBS + 0,5% BSA при концентрации 300 нКи/200 мкл. Порции этого раствора дополняли охлажденным (немеченым) E01 Аднектином или охлажденным (немеченым) Аднектином (контроль) до конечной концентрации 450 нмоль/л. Образцы клеток центрифугировали в течение 5 мин при  $200 \times g$ , затем ресуспендировали в 200 мкл соответствующего меченого радиоактивным изотопом  $^{18}F$  раствора E01-4PEG-DBCO и инкубировали на льду в течение 1 ч. После инкубации образцы клеток центрифугировали при  $200 \times g$  и супернатант удаляли. Клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл PBS + 0,5% BSA и процедуру промывки повторяли 3 раза. После последней промывки клетки снова центрифугировали при  $200 \times g$  и супернатант удаляли. Затем измеряли радиоактивность оставшегося клеточного осадка с помощью гамма-счетчика.

Результаты показали, что все мечение было специфическим, что подтверждается дифференциальной ассоциацией меченого радиоактивным изотопом  $^{18}F$  E01-4PEG-DBCO с PD-L1-положительными клетками L2987 по сравнению с PD-L1-отрицательными клетками HT-29 (связанная с клетками радиоактивность была в 44,6 раз выше в PD-L1-положительных клетках L2987). Специфичность дополнительно подтверждалась, о чем свидетельствовало заметное снижение ассоциированного с клетками меченого радиоактивным изотопом  $^{18}F$  E01-4PEG-DBCO при совместной инкубации с дополнительным охлажденным (немеченым) E01 Аднектином при концентрации 450 нмоль/л (снижение на 99,6%). Ассоциированный с клетками  $^{18}F$ -E01 незначительно снижался (незначительное снижение на 9,9%) при совместной инкубации клеток с охлажденным (немеченым) Аднектином, не связывающимся с PD-L1, при концентрации 450 нмоль/л.

В целом, эти результаты показали способность меченого радиоактивным изотопом  $^{18}F$  E01-4PEG-DBCO дифференцировать PD-L1(+) от PD-L1(-) клеток *in vitro*.

Пример 11. Проведение различия между PD-L1-положительными опухолями и PD-L1-отрицательными опухолями *in vivo* с помощью визуализирующего агента анти-PD-L1 Аднектина.

В этом эксперименте меченый радиоактивным изотопом  $^{18}F$  PD-L1 Аднектин со следующей аминокислотной последовательностью:

EVVAATPTSLISW SYDGPIDRY YRITYGETGGNSPVQEFTV PPDQKT ATISGLKPG

VDYITIVYA VRLEEAHYNREFP ISINYRTPC (A02; SEQ ID NO: 2)

получали, как описано в примере 9, и тестировали на способность проводить различие между PD-L1-положительными опухолями и PD-L1-отрицательными опухолями у мышей.

Мышей, несущих билатеральные ксенотрансплантаты опухолей, получали путем подкожного введения  $1 \times 10^6$  PD-L1(+) клеток карциномы легкого человека L2987 и  $1,5 \times 10^6$  PD-L1(-) клеток карциномы толстой кишки человека HT-29 в противоположные бока мышей. После достижения размера опухолей приблизительно  $300 \text{ мм}^3$  (примерно через 2-3 недели после имплантации клеток) животных отбирали для визуализации. Для визуализации животных анестезировали 2% изофлураном и устанавливали катетеры в хвостовую вену. Затем мышей помещали в специально разработанный фиксатор для удерживания животных, рассчитанный на 4 животных, где они оставались под анестезией на протяжении всего исследования. Фиксатор для удерживания животных переносили на сканнер microPET® F120™ (Siemens Pre-clinical Solutions, Knoxville, TN). Аксиальное поле зрения этого прибора составляет 7,6 см. При этом ограничении животных располагали таким образом, что область сканирования находилась от области прямо перед глазами примерно до основания хвоста.

Сначала получали 10-минутное трансмиссионное изображение с помощью внешнего источника излучения  $^{57}Co$  для корректировки на аттенуацию конечных PET-изображений. После проведения трансмиссионного скана растворы радиотрейсеров вводили через ранее установленные в хвостовую вену катетеры и через 2 ч получали эмиссионное изображение. Введенные растворы радиотрейсеров состояли приблизительно из 200 мКи меченого радиоактивным изотопом  $^{8}F$  A02 или 200 мКи меченого радиоактивным изотопом  $^{18}F$  A02, дополненного охлажденным немеченым A02 Аднектином в конечной концентрации 3 мг/кг (исходя из индивидуального веса животного). Все растворы для инъекций готовили в

200 мкл солевого раствора перед инъекцией. Точные введенные дозы рассчитывали путем прямого измерения изготовленной дозы и вычитания радиоактивности, оставшейся в шприце и катетере, вставленном в хвостовую вену.

Изображения реконструировали с использованием алгоритма максимума апостериорной вероятности (MAP) с корректировкой на аттенуацию с использованием собранных трансмиссионных изображений и корректировали на распад радиоактивных изотопов. На конечных изображениях области интереса (ROI) очерчивали вокруг границы опухоли с использованием программного обеспечения ASIPro (Siemens Preclinical Solutions). Для каждой области интереса (ROI) рассчитывали кривые изменения активности во времени с получением количественного вида радиотрейсера в пределах объема опухоли на протяжении 2-часового периода получения эмиссионного изображения. Для окончательного сравнения индивидуальные кривые изменения активности во времени нормализовали по введенной дозе радиотрейсера для каждого конкретного животного. Поглощение радиотрейсера сравнивали между опухолями, используя последние 10 мин каждой кривой изменения активности во времени (через 1 ч 50 мин - 2 ч после введения радиотрейсера). С использованием этой методологии поглощение радиотрейсера в PD-L1(+) ксенотрансплантатах L2987 в 3,05 раза превышало поглощение, наблюдаемое в PD-L1(-) ксенотрансплантатах HT-29 у животных, получавших только радиотрейсер  $^{64}\text{Cu}$ -A01. У животных, которым совместно вводили меченый радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  радиотрейсер A02 и 3 мг/кг немеченого A02 Аднектина, поглощение в PD-L1(+) ксенотрансплантатах L2987 только в 1,04 раза превышало поглощение, наблюдаемое в PD-L1(-) ксенотрансплантатах HT-29.

Для некоторых исследований животных умерщвляли путем цервикальной дислокации сразу же после визуализации. Затем животных подвергали некропсии и в предварительно взвешенные пробирки собирали отдельные ткани (кровь, сердце, легкие, печень, селезенка, почки, мышца, желудок, костная ткань, опухоль L2987 и опухоль HT-29). Затем все ткани снова взвешивали для определения массы каждой ткани. Затем радиоактивность в каждой ткани напрямую измеряли *ex vivo* с использованием гамма-счетчика Perkin-Elmer Wizard3. Для всех тканей измеренные значения в импульсах в минуту (CPM) нормализовали по введенной радиоактивной дозе для индивидуальных животных и корректировали на радиоактивный распад. Эти результаты затем наносили на график, чтобы продемонстрировать биораспределение радиотрейсера, как показано на фиг. 2.

Эти результаты показали четкое дифференциальное поглощение радиотрейсера в PD-L1(+) ксенотрансплантатах L2987 по сравнению с PD-L1(-) ксенотрансплантатами HT-29. Кроме того, единственной тканью, которая показала более высокое поглощение в PD-L1, как и ожидалось, являлась почка, так как предполагается, что выведение меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  A02-4PEG-DBCO Аднектина происходит посредством фильтрации в почках исходя из молекулярной массы молекулы.

В целом, эти результаты обеспечивают прямую визуализацию дифференциации PD-L1(+) и PD-L1(-) ксенотрансплантатов опухолей *in vivo*. Специфичность была дополнительно продемонстрирована при совместной инъекции с 3 мг/кг немеченого анти-PD-L1 A02 Аднектина, что вызвало уменьшение поглощения радиотрейсера в PD-L1(+) опухолях до уровня PD-L1(-) ксенотрансплантатов. Максимальное соотношение величин поглощения радиотрейсера в HPD-L1(+) ксенотрансплантатах L2987 и HPD-L1(-) ксенотрансплантатах HT-29 составило 3,53:1 при использовании радиотрейсера  $^{18}\text{F}$ -A02 Аднектина. Это дополнительно подтверждает возможность применения анти-PD-L1 Аднектина для визуализации экспрессии PD-L1 в ткани при помощи PET-визуализации. Аналогичные эксперименты с использованием  $^{18}\text{F}$  в качестве радионуклида проводили на мышах с получением сходных результатов.

Пример 12. Визуализация *in vivo* у макак-крабоедов.

Меченые радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  визуализирующие агенты E01 также показали сходные результаты в исследовании на макаках-крабоедах. В этих исследованиях анти-PD-L1  $^{18}\text{F}$ -E01, полученный способом, описанным в примере 9, тестировали на способность обеспечивать высококонтрастные изображения у макак-крабоедов. Анти-PD-L1 Аднектины, описанные здесь, сохраняют высокую аффинность в отношении PD-L1 макак-крабоедов (но имеют низкую аффинность в отношении PD-L1 грызунов). Кроме того, поскольку макаки-крабоеды не содержат PD-L1(+) опухолей, как в мышечных моделях, характеристики визуализации оценивали главным образом на фоновых уровнях, измеряемых на изображениях в контексте эндогенной экспрессии PD-L1 (с низким фоном, обеспечивая потенциал для высокочувствительной детекции PD-L1(+) тканей). В этих исследованиях фоновые уровни на конечных PET-изображениях были очень низкими с заметным накоплением радиотрейсера главным образом в почках, селезенке и мочевом пузыре.

Самцов макак-крабоедов с ранее установленной порт-системой сосудистого доступа (VAP) анестезировали атропином в дозе 0,02 мг/кг, Телазолом в дозе 5 мг/кг и бупренорфином в дозе 0,01 мг/кг *I.M.* (внутримышечно) (все набраны в один шприц). Затем внутривенный катетер вводили в цефалическую вену для введения жидкости во время процедуры визуализации для поддержания гидратации. Животных интубировали эндотрахеальной трубкой - обычно 3,0 мм - и переносили на диагностическую кровать для визуализации при помощи сканера microPET® F220™ (Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN). Анестезию поддерживали с помощью изофлурана и кислорода, и раствор Хартмана (LRS) вводили внутривенно (*I.V.*) со скоростью 6 мл/кг/ч во время процедуры визуализации. Так как аксиальное поле зрения

сканера microPET® F220™ составляет всего 7,6 см, изображения получали в 5 различных позициях диагностической кровати, создавая в итоге сборное изображение животных в области от чуть выше сердца до приблизительно таза.

Сначала для каждого поля зрения в течение 10 мин получали трансмиссионное изображение с использованием внешнего источника  $^{57}\text{Co}$  с целью корректировки на аттенуацию конечных PET-изображений. После получения трансмиссионных изображений для всех позиций диагностической кровати вводили приблизительно 1,5 мКи (приблизительно 0,015 мг/кг) радиотрейсера  $^{18}\text{F}$ -E01 Аднектина через установленный VAP. Затем последовательно получали эмиссионные сканы продолжительностью по 5 мин для каждой позиции диагностической кровати, начиная с положения 1, центрированного приблизительно в области сердца, и двигаясь в сторону таза животного. После получения изображений в каждой позиции (с 1 по 5) диагностическую кровать перемещали обратно в позицию 1 и процесс повторяли. Используя эту процедуру, получали всего 5 различных изображений для каждой позиции диагностической кровати во время исследования путем визуализации.

Индивидуальные изображения реконструировали с использованием фильтрованного алгоритма обратной проекции (FBP) с корректировкой на аттенуацию с использованием собранных трансмиссионных изображений и корректировали на радиоизотопный распад. Затем конечные сборные изображения получали путем совмещения изображений, полученных во всех 5 позициях диагностической кровати за один проход (т.е. одно сборное изображение получали из каждого набора последовательных изображений в позициях кровати с 1 по 5), охватывая тем самым всю продолжительность исследования путем визуализации (фиг. 3). Конечные изображения изучали визуально, отмечая области видимого поглощения радиотрейсера (т.е. селезенка, почки, мочевого пузыря) и фоновой ткани (мышцы). Фоновое накопление  $^{18}\text{F}$ -E01 Аднектина было очень низким, с незначительным сигналом, наблюдаемым в фоновых тканях, таких как мышца. Кроме того, поглощение подтверждалось в селезенке, которая, как полагают, является PD-L1(+) на основе экспрессии мРНК. Таким образом, исследования на макаках-крабоедах демонстрируют потенциал для высокочувствительной визуализации PD-L1 в контексте эндогенного PD-L1.

В целом, PET-исследования на грызунах и макаках-крабоедах показали, что  $^{18}\text{F}$ -меченые белки, полученные в соответствии с описанными здесь способами, обеспечивают мощные и специфические зонды для *in vivo* меченых положительных в отношении мишени тканей с возможностью высокочувствительной детекции тканей с низким уровнем экспрессии мишени.

Пример 13. Авторадиография *in vitro* с использованием [ $^{18}\text{F}$ ]-A02 анти-PD-L1 Аднектина.

Опухолевые ткани легких человека заливали средой, обеспечивающей оптимальные условия разрезания при данной температуре (optimal cutting temperature, OCT) и охлаждали в 2-метилбутане в течение 2-5 мин до замораживания. Образцы хранили в морозильной камере при  $-80^\circ\text{C}$  до использования. Также, в анализ включали ткани ксенотрансплантата человека. Мышей, несущих билатеральные ксенотрансплантаты, получали путем подкожного введения  $4 \times 10^6$  PD-L1(+) клеток L2987 и  $1,5 \times 10^6$  PD-L1(-) клеток HT-29 в противоположные бока бестимусных мышей. После достижения подходящего размера опухолей (приблизительно 200-300 мм<sup>3</sup>) мышей анестезировали 2% изофлурана и умерщвляли путем цервикальной дислокации. Свежие опухолевые ткани вырезали, заливали OCT и охлаждали в 2-метилбутане в течение 2-5 мин до замораживания. Затем ткани заворачивали в фольгу/пакет ZIPLOC® и хранили при  $-80^\circ\text{C}$  до использования. Для всех тканей (опухоль легких человека и ксенотрансплантаты) изготавливали на криостате срезы толщиной 5 мкм (собранные в виде 2 срезов на предметное стекло), монтировали в оттаявшем состоянии на предметные стекла микроскопа и высушивали на воздухе в течение примерно 30 мин.

Исследования блокирования с использованием охлажденного (немеченого) A02 Аднектина при концентрации 0,025, 0,25, 2,5 и 25 нмоль/л, соответственно, и Аднектина, не связывающегося с PD-L1, при концентрации 25 нмоль/л, проводили с использованием следующих условий. Индивидуальные предметные стекла, 1 предметное стекло на концентрацию, помещали в пластиковые кассеты для предметных стекол и предварительно инкубировали в блокирующем белковом бессывороточном растворе Dako в течение 30 мин. Затем предметные стекла переносили в камеры для инкубации предметных стекол для дальнейшей инкубации. Отдельно готовили маточный раствор  $^{18}\text{F}$ -A02 Аднектина с концентрацией 0,25 нмоль/л путем разбавления 10,6 мкл исходного маточного раствора радиолиганда (7064 нмоль/л на момент эксперимента) 300 мл PBS + 0,5% BSA. Из этого маточного раствора 40 мл добавляли в каждую инкубационную камеру. Одна из этих камер содержала только буферный раствор радиолиганда, который называется срезом общего связывания. Другие инкубационные камеры получали 40 мл этого маточного раствора вместе с соответствующей концентрацией блокирующего соединения (немеченый A02 Аднектин при концентрации 0,025, 0,25, 2,5 или 25 нмоль/л или немеченый Аднектин при концентрации 25 нмоль/л). Предметные стекла инкубировали в отдельных буферных растворах в течение 1 ч при комнатной температуре до достижения максимального связывания. После инкубации предметные стекла каждой лечебной группы удаляли из инкубационных растворов и помещали в ледяной промывочный буфер (PBS + 0,5% BSA) на 3 мин и споласкивали 4 раза. Затем предметные стекла сушили в потоке холодного воздуха в течение приблизительно 30 мин. Высушенные на воздухе предметные стекла экспонировали путем помещения их на пластину Imaging Plate (BAS-SR 3545S) в течение ночи при комнатной

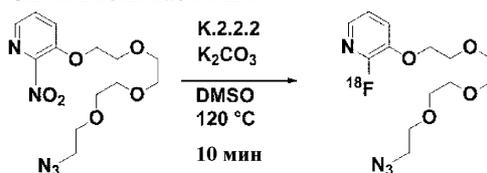
температуре. Пластины Imaging Plate сканировали с использованием анализатора Bioimaging Analyzer (Fujifilm Fluorescent Image Analyzer, FLA-9000). Размер пикселя изображений автордиограмм составил 100 мкм. Анализ изображений выполняли с использованием программного обеспечения Multi-Gauge. Области интереса (ROI) очерчивали вокруг всей опухолевой ткани во всех исследуемых группах. Авторадиографический сигнал от связанной с тканью радиоактивности количественно определяли из этих областей интереса (ROI).

Кажущееся смещение радиолиганда  $^{18}\text{F}$ -A02 Аднектина при сравнении со срезами общего связывания определяли для 4 различных концентраций (0,025, 0,25, 2,5 и 25 нмоль/л) немеченого A02 Аднектина в срезах опухоли легких человека, а также срезах ксенотрансплантата человека. Дозозависимое смещение  $^{18}\text{F}$ -A02 наблюдалось во всех срезах тканей с добавлением немеченого A02 Аднектина. Не связывающийся с PD-L1 Аднектин с концентрацией 25 нмоль/л показал минимальную блокаду во всех тканях по сравнению с общим связыванием (фиг. 4А).

Серийные срезы тканей толщиной 5 мкм, полученные от каждой ткани, подвергали иммуногистохимической процедуре против человеческого PD-L1 для подтверждения уровня экспрессии антигена PD-L1 в образцах (фиг. 4В).

В целом, эти результаты обеспечивают прямую визуализацию PD-L1 в образцах опухолей легких человека, а также тканей ксенотрансплантата человека. Уровень связывания радиолиганда в индивидуальных тканях соответствует интенсивности окрашивания PD-L1 замороженных срезов по данным ИХС (иммуногистохимический анализ). Кроме того, дозозависимая блокада рецептора немеченым анти-PD-L1 A02 Аднектином (и отсутствие блокады немеченым Аднектином, не связывающимся с PD-L1) дополнительно подтверждает применение  $^{18}\text{F}$ -A02 для визуализации экспрессии в тканях PD-L1 с использованием PET-визуализации.

Пример 14. Автоматизированное производство [ $^{18}\text{F}$ ]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина в соответствии с общей процедурой радиохимического синтеза с использованием коммерческого модуля синтеза GE TRACERlab FX2 N



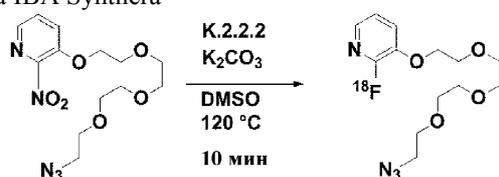
Процедура.

Автоматизированный синтез [ $^{18}\text{F}$ ]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина осуществляли с использованием модуля синтеза GE TRACERlab FX2 N некассетного типа. Технические характеристики модуля синтеза представлены в табл. 1 и на фиг. 6. Водный раствор [ $^{18}\text{F}$ ]-фторида (2,0 мл, 29,6 ГБк/800 мКи) наносили на картридж Sep-Pak light QMA [картридж Sep-Pak light QMA предварительно последовательно кондиционировали 5 мл 0,5М бикарбоната калия, 5 мл деионизированной воды и 5 мл ацетонитрила перед использованием]. После завершения этого переноса водный раствор [ $^{18}\text{F}$ ]-фторида высвобождали из картриджа QMA Sep-Pak путем добавления в реактор смеси для элюирования (из "V1"). Растворитель выпаривали в слабом потоке азота и вакууме. Раствор прекурсора (из "V3") добавляли к высушенному остатку криптана и эту реакционную смесь нагревали при 120°C в течение 10 мин. Затем в реактор в сырую реакционную смесь добавляли 4 мл дистиллированной воды (из "V4") и смесь переносили в петлевой дозатор для ввода пробы объемом 5 мл полупрепаративной HPLC посредством датчика уровня жидкости, контролирующего завершение загрузки. Смесь наносили на колонку полупрепаративной HPLC (Luna C18(2), 250×10 мм, Phenomenex). Колонку элюировали смесью 35% ацетонитрила в 0,1%-ном водном растворе трифторуксусной кислоты со скоростью 4,6 мл в минуту. Продукт собирали из этой колонки HPLC в камеру разбавления, которая содержала 15 мл дистиллированной воды, и все ее содержимое переносили на картридж для твердофазной экстракции tC18, 1 г. Из этого картриджа с помощью 3 мл этанола высвобождали 352 мКи (13 ГБк) [ $^{18}\text{F}$ ]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина (из "V14"), который можно использовать для создания  $^{18}\text{F}$ -меченых биологических продуктов путем использования преимущества "клик" азид-алкиновой реакции с соответствующим биологическим препаратом, содержащим алкины.

Таблица 1

Флакон 1 (V1)	16 мг К.2.2.2, 3 мг карбоната калия, растворенного в 0,1 мл дистиллированной воды и 1,4 мл ацетонитрила
Флакон 3 (V3)	2 мг 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-нитропиридин в 0,5 мл DMSO
Флакон 4 (V4)	4 мл дистиллированной воды
Флакон 14 (V14)	3 мл 100% этанола
Камера разбавления	15 мл дистиллированной воды
Картридж 1 (C1)	tC18, 6 cc, 1g sep pack
Колонка HPLC	Luna C18 (2), 250x10 мм, 5 мкм, Phenomenex
Растворитель HPLC	35% ацетонитрила в 0,1% водном растворе трифторуксусной кислоты
Скорость потока HPLC	4,6 мл/мин

Пример 15. Автоматизированное производство [ $^{18}\text{F}$ ]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина в соответствии с общей процедурой радиохимического синтеза с использованием коммерческого модуля синтеза IBA Synthera



#### Процедура.

Автоматизированный синтез [ $^{18}\text{F}$ ]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина осуществляли с использованием модуля синтеза IBA Synthera кассетного типа и соответствующим образом собранного комплекта Integrator Fluidic Processor. Комплект Integrator Fluidic Processor (IFP) загружали подходящими для этого синтеза прекурсорами, представленными в табл. 2. Очистку выполняли на жидкостном хроматографе Varian HPLC. Заполнение петлевого дозатора HPLC контролировали устойчивым потоком азота на модуле HPLC. Технические характеристики обоих автоматизированных модулей приведены в табл. 2. Водный раствор [ $^{18}\text{F}$ ]-фторида (2,0 мл, 29,6 ГБк/800 мКи) нагружали на картридж Sep-Pak light QMA [картридж Sep-Pak light QMA предварительно последовательно кондиционировали 5 мл 0,5М бикарбоната калия, 5 мл деионизированной воды и 5 мл ацетонитрила перед использованием]. После завершения этого переноса водный раствор [ $^{18}\text{F}$ ]-фторида высвобождали из картриджа QMA Sep-Pak путем добавлением в реактор смеси для элюирования (из "V1"). Растворитель выпаривали при слабом потоке азота и вакуума. Раствор прекурсора (из "V2") добавляли к высушенному остатку криптанда и полученную реакционную смесь нагревали при 120°C в течение 10 мин. Затем 3 мл дистиллированной воды (из "V4") добавляли в реактор в сырую реакционную смесь и полученную смесь переносили в петлевой дозатор для ввода пробы объемом 5 мл полупрепаративной HPLC посредством датчика уровня жидкости, контролирующего завершение загрузки. Смесь наносили на колонку полупрепаративной ВЭЖХ (Luna C18(2), 250x10 мм, Phenomenex). Колонку элюировали смесью 35% ацетонитрила в 0,1%-ном водном растворе трифторуксусной кислоты со скоростью 4,6 мл в минуту. Продукт собирали из этой колонки HPLC в камеру разбавления, которая содержала 15 мл дистиллированной воды, и все ее содержимое переносили на картридж для твердофазной экстракции tC18, 1 г. Из этого картриджа с помощью 3 мл этанола высвобождали 325 мКи (12 ГБк) [ $^{18}\text{F}$ ]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина, который можно использовать для создания  $^{18}\text{F}$ -меченных биологических продуктов, используя преимущество "клик" азид-алкиновой реакции с соответствующим биологическим препаратом, содержащим алкины.

Таблица 2

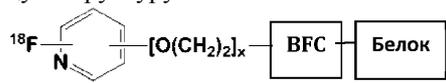
Флакон 1 (V1)	22 мг К.2.2.2, 4 мг карбоната калия, растворенного в 0,3 мл дистиллированной воды и 0,3 мл ацетонитрила
Флакон 2 (V2),	2 мг 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-нитропиридина в 0,5 мл DMSO
Флакон 4 (B4)	3 мл дистиллированной воды
Камера разбавления	15 мл дистиллированной воды
Картридж 1 (C1)	tC18, 6 cc, 1 g sep pack
Колонка HPLC	Luna C18(2), 250x10 мм, 5 мкм, Phenomenex
Растворитель HPLC	35% ацетонитрила в 0,1%-ном водном растворе трифторуксусной кислоты
Скорость потока HPLC	4,6 мл/мин

Эквиваленты.

Специалистам в данной области будет понятно или они, используя не более чем обычное экспериментирование, смогут определить множество эквивалентов описанных в настоящем документе определенных вариантов осуществления изобретения. Такие эквиваленты охватываются следующей формулой изобретения.

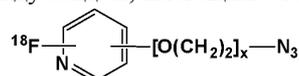
#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка, содержащий меченую радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  простетическую группу, бифункциональный конъюгирующий (BFC) фрагмент и белок, при этом зонд имеет следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль, где:

- (a)  $^{18}\text{F}$  находится в положении 2 пиридинового кольца и x представляет собой целое число от 1 до 8;  
 (b) BFC представляет собой бифункциональный конъюгирующий фрагмент, ковалентно связанный с меченой радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  простетической группой, где ковалентная связь образована 1,3-диполярным циклоприсоединением между азидом, имеющим следующую структуру:



и циклооктиновой группой у BFC;

(c) BFC содержит фрагмент полиэтиленгликоля (PEG)<sub>y</sub> в качестве спейсерной группы, где y представляет собой целое число от 1 до 8 и где (PEG)<sub>y</sub> в качестве спейсерной группы содержит химическую группу, ковалентно связанную с аминовой, карбоксильной, карбонильной или тиольной группой на белке; и

(d) белок представляет собой антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела или каркас на основе фибронектина.

2. Зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по п.1, отличающийся тем, что фрагмент  $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$  присутствует в положении 3 пиридинового кольца.

3. Зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по п.1, отличающийся тем, что фрагмент  $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$  присутствует в положении 2 пиридинового кольца.

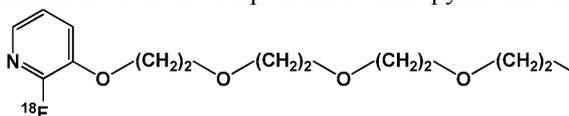
4. Зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по п.1, отличающийся тем, что фрагмент  $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$  присутствует в положении 4 пиридинового кольца.

5. Зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что x представляет собой целое число от 2 до 6.

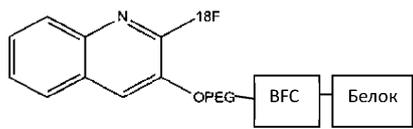
6. Зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по п.5, отличающийся тем, что x представляет собой целое число от 3 до 5.

7. Зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по п.5, отличающийся тем, что x равно 4.

8. Зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что меченая радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  простетическая группа имеет структуру

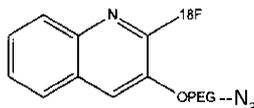


9. Зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка, содержащий меченую радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  простетическую группу, бифункциональный конъюгирующий (BFC) фрагмент и белок, при этом зонд имеет следующую структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль, где:

- (а) "OPEG" представляет собой  $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$  и  $x$  представляет собой целое число от 1 до 8;  
 (б) BFC представляет собой бифункциональный конъюгирующий фрагмент, ковалентно связанный с меченой радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  простетической группой, где ковалентная связь образована 1,3-диполярным циклоприсоединением между азидом, имеющим следующую структуру:



и циклооктиновой группой у BFC;

- (с) BFC содержит фрагмент полиэтиленгликоля (PEG)<sub>y</sub> в качестве спейсерной группы, где  $y$  представляет собой целое число от 1 до 8; и где фрагмент полиэтиленгликоля (PEG)<sub>y</sub> в качестве спейсерной группы содержит химическую группу, ковалентно связанную с аминовой, карбоксильной, карбонильной или тиольной группой на белке; и

(d) белок представляет собой антитело, фрагмент антитела или каркас на основе фибронектина.

10. Зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по п.9, отличающийся тем, что  $x$  представляет собой целое число от 2 до 6, или его фармацевтически приемлемая соль.

11. Зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по п.9, отличающийся тем, что  $x$  представляет собой целое число от 3 до 5, или его фармацевтически приемлемая соль.

12. Зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по п.9, отличающийся тем, что  $x$  равно 4.

13. Зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что ковалентная связь между меченой радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  простетической группой и BFC образована 1,3-диполярным циклоприсоединением между азидом и агентом на основе дибензоциклооктина.

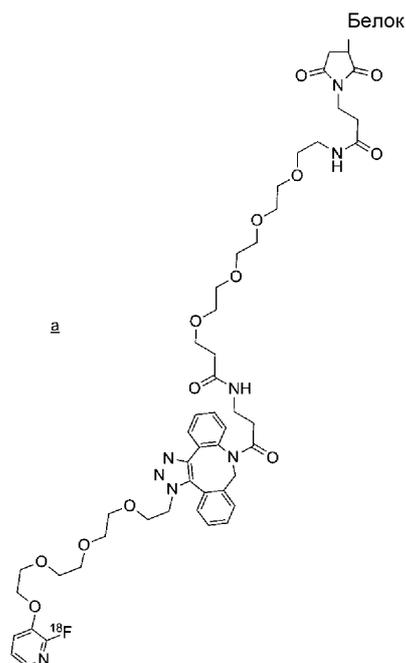
14. Зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по п.13, отличающийся тем, что агент на основе дибензоциклооктина представляет собой агент на основе азадибензоциклооктина.

15. Зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по любому из пп.1-14, отличающийся тем, что  $y$  представляет собой целое число от 2 до 6.

16. Зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по п.15, отличающийся тем, что  $y$  равно 4 или 5.

17. Зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по п.14, отличающийся тем, что агент на основе азадибензоциклооктина представляет собой DBCO-PEG4-NHS-сложный эфир, DBCO-PEG4-кислота, DBCO-PEG4-амин или DBCO-PEG4-малеимид.

18. Зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по п.1, имеющий следующую структуру:



отличающийся тем, что группа BFC-фрагмента ковалентно связана с тиольной группой на цистеиновом остатке белка.

19. Зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по п.18, отличающийся тем, что цистеиновый остаток расположен на С-конце белка.

20. Зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по любому из пп.1-19, отличающийся тем, что белковая часть зонда связывается с биологической молекулой, ассоциированной с заболеванием, выбранным из группы, состоящей из солидного рака, гематопозитического рака, гематологического рака, аутоиммунного заболевания, нейродегенеративного заболевания, сердечно-сосудистого заболевания и патогенной инфекции.

21. Зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по любому из пп.1-19, отличающийся тем, что зонд связывается с опухоль-ассоциированным антигеном или с белком, присутствующим на патогенном организме.

22. Применение зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по п.20 или 21 в способе определения наличия заболевания у субъекта, при этом способ включает:

(а) введение субъекту, нуждающемуся в этом, зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка, который связывается с молекулой-мишенью, ассоциированной с наличием заболевания; и

(б) получение радиоизображения по меньшей мере части субъекта для детекции присутствия или отсутствия зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка,

при этом присутствие и локализация зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка выше исходного уровня указывает на наличие и локализацию заболевания.

23. Применение зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по п.20 или 21 для мониторинга прогрессирования заболевания у субъекта, включающее:

(а) введение субъекту, нуждающемуся в этом, зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка, который связывается с молекулой-мишенью, ассоциированной с наличием заболевания, в первый момент времени и получение изображения по меньшей мере части субъекта для определения количества пораженных заболеванием клеток или ткани; и

(б) введение субъекту зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка в один или несколько последовательных моментов времени и получение изображения по меньшей мере части субъекта в каждый момент времени,

при этом размер и локализация пораженных заболеванием клеток или ткани в каждый момент времени указывает на прогрессирование заболевания.

24. Применение зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по п.20 или 21 в способе количественного определения пораженных заболеванием клеток или тканей у субъекта, при этом способ включает:

(а) введение субъекту, имеющему пораженные заболеванием клетки или ткани, зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка, который связывается с молекулой-мишенью, локализованной в пораженных заболеванием клетках или тканях; и

(б) детекцию радиоактивного излучения  $^{18}\text{F}$  в пораженных заболеванием клетках или ткани, при этом уровень и распределение радиоактивного излучения в пораженных заболеванием клетках или тканях является количественным показателем пораженных заболеванием клеток или тканей.

25. Применение зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по п.20 или 21 в способе скрининга агента для лечения заболевания, включающий следующие стадии:

(а) приведения в контакт клеток, экспрессирующих белок-мишень, ассоциированный с заболеванием, с зондом на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка, который связывается с белком-мишенью, в присутствии и отсутствии агента-кандидата; и

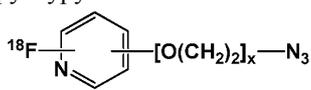
(б) визуализацию клеток в присутствии и отсутствии агента-кандидата с использованием позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ),

при этом уменьшение величины радиоактивного излучения в присутствии агента-кандидата указывает на то, что агент связывается с белком-мишенью.

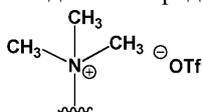
26. Фармацевтическая композиция для применения в получении радиоизображения пораженных заболеванием клеток или ткани субъекта, содержащая зонд на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по любому из пп.1-22.

27. Набор для получения зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка по любому из пп.1-21, содержащий:

а) азид, имеющий следующую структуру:



где x представляет собой целое число от 1 до 8 и R представляет собой  $\text{NO}_2$ , Br, F или

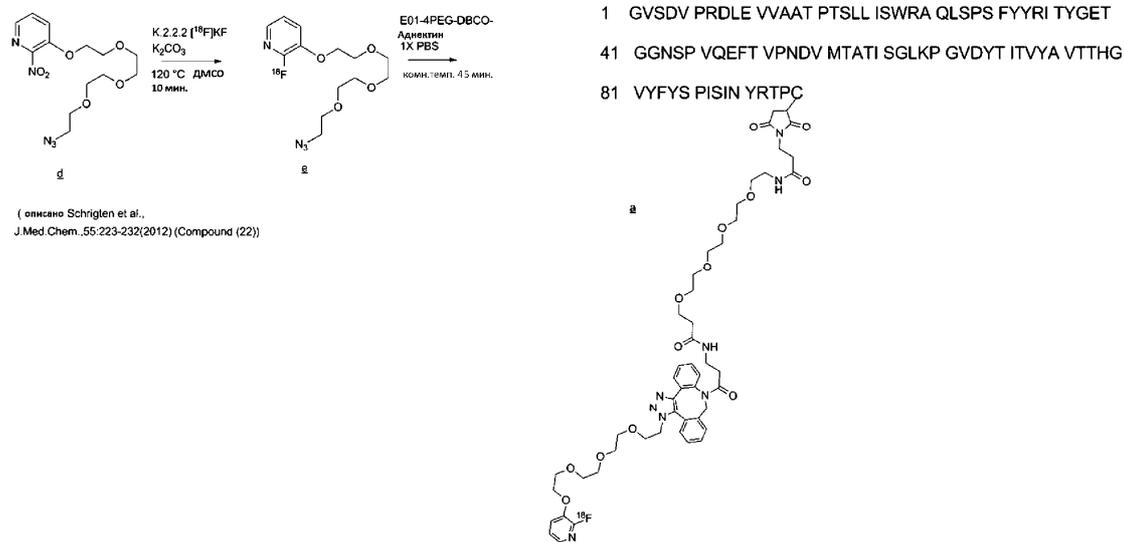


и находится в орто-положении относительно атома N пиридинового кольца;

б) белок, связанный с BFC, содержащий фрагмент полиэтиленгликоля (PEG)<sub>y</sub> в качестве спейсерной группы, где y представляет собой целое число от 1 до 8 и где (PEG)<sub>y</sub> в качестве спейсерной группы содержит химическую группу, ковалентно связанную с аминовой, карбоксильной, карбонильной или тильной группой на белке; и где белок представляет собой антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела или каркас на основе фибронектина;

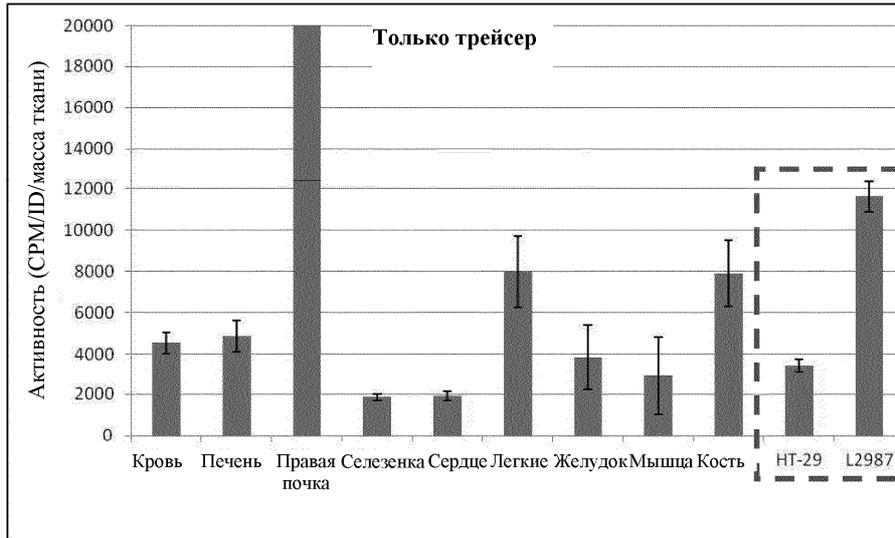
с) реагенты для образования ковалентной связи между азидом и белком, связанным с BFC; и

д) инструкции по изготовлению зонда на основе меченого радиоактивным изотопом  $^{18}\text{F}$  белка.

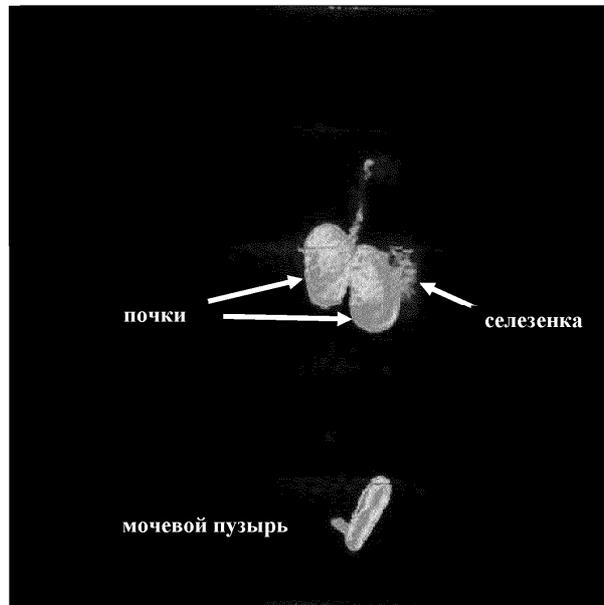


Фиг. 1

( описано Schriglen et al.,  
J. Med. Chem. .55:223-232(2012) (Compound (22))

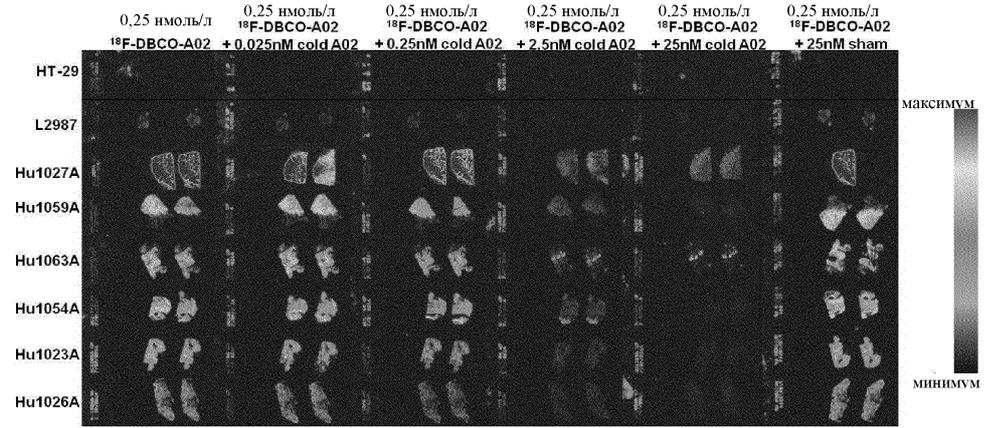


Фиг. 2

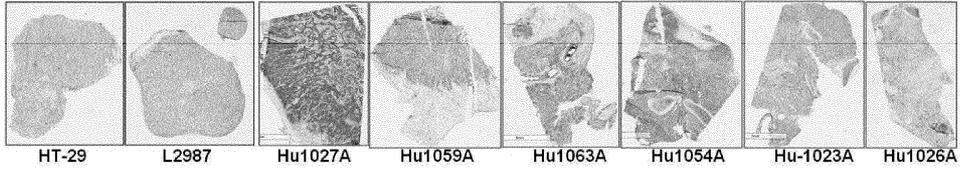


Фиг. 3

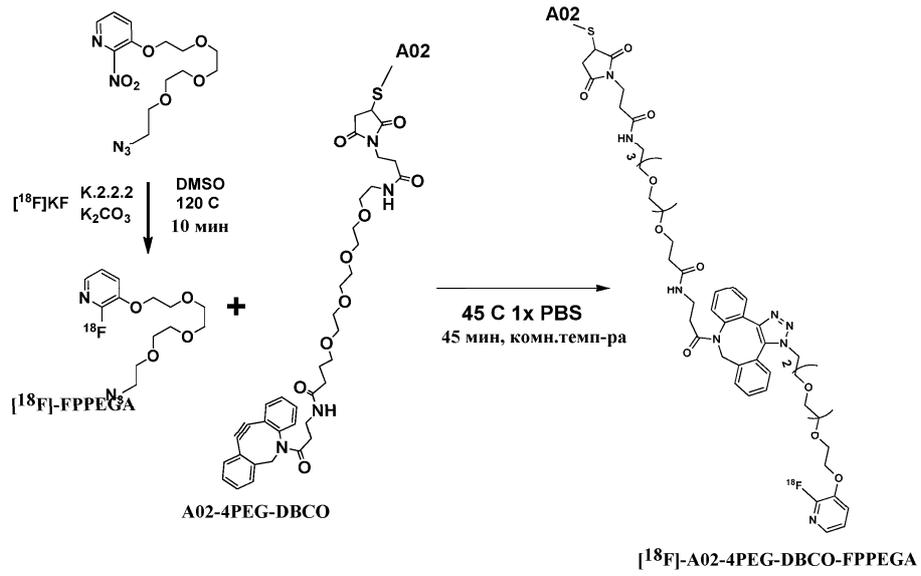
A.



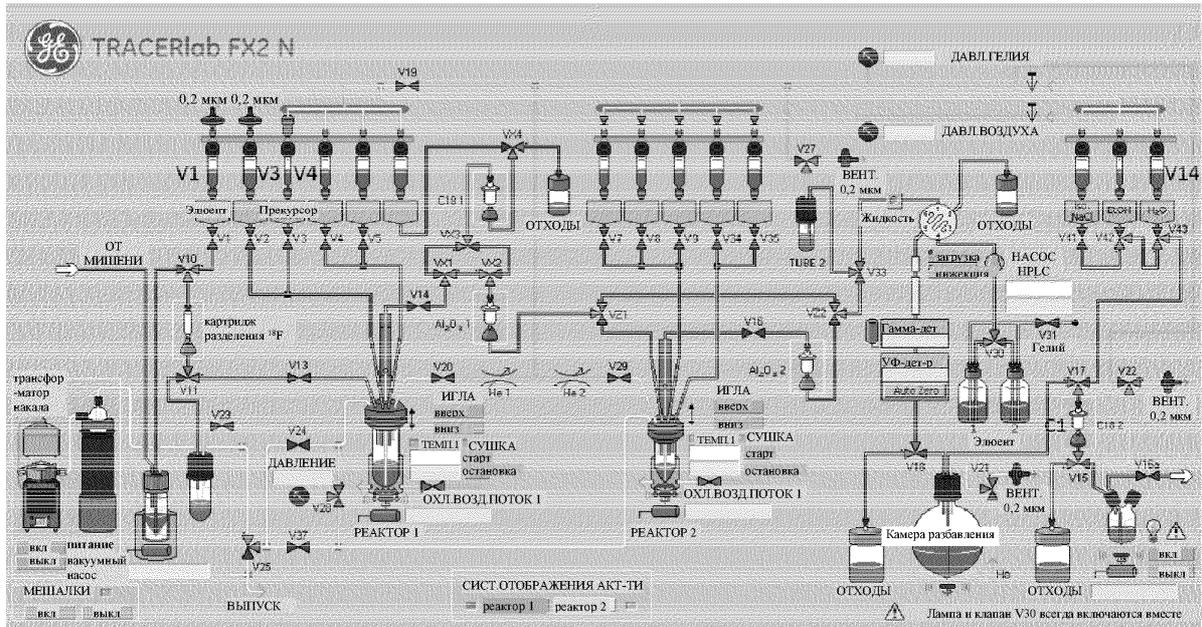
B.



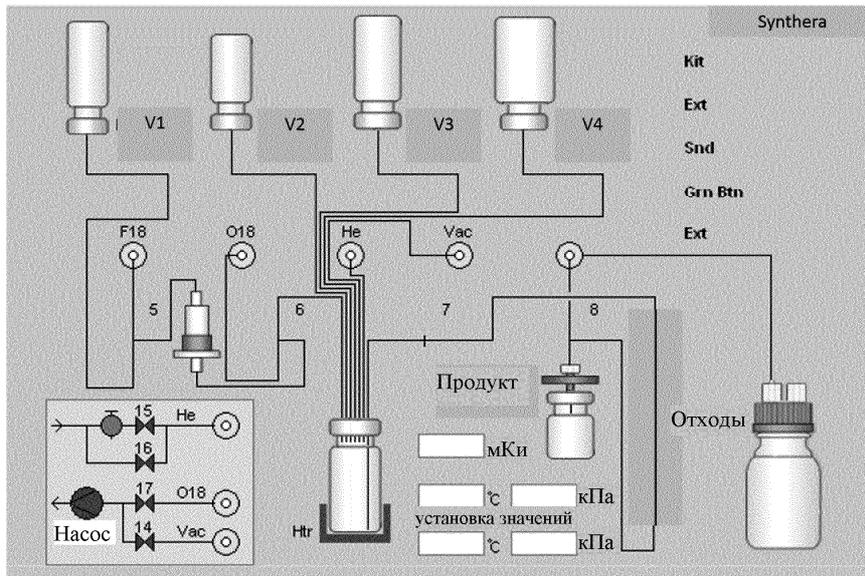
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7