(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201991812 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.01.23

(22) Дата подачи заявки
2018.01.30

(51) Int. Cl. ***A61K 51/08*** (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 101/02 (2006.01)
A61K 103/00 (2006.01)
A61K 103/20 (2006.01)
A61K 103/30 (2006.01)
A61K 103/32 (2006.01)
C07K 7/02 (2006.01)
C07K 7/04 (2006.01)
C07K 7/64 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ И ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ РАКА

(31) **17305098.0**
(32) **2017.01.30**
(33) **EP**
(86) **PCT/EP2018/052234**
(87) **WO 2018/138372 2018.08.02**

(71) Заявитель:
ВЕКТ-ОРУС; САНТР НАСЬОНАЛЬ ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ СЬЕНТИФИК; ЮНИВЕРСИТЭ ДЕ' Э-МАРСЕЙ (FR)

(72) Изобретатель:
Малисе Седрик, Лекорш Паскалин, Новак Джонатан, Давид Марион, Темсамани Джамаль, Крещатиски Мишель (FR)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к конъюгированному соединению, содержащему фармацевтически приемлемый маркер M и пептид или псевдопептид P, имеющий не более 30 аминокислотных остатков и способный связываться с рецептором липопротеинов низкой плотности (LDLR), и к его применению в способе маркировки и/или обнаружения и/или лечения раковых клеток у субъекта путем введения конъюгированного соединения субъекту с помощью анализа присутствия и/или количества маркера.

201991812 A1

201991812 A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ И ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ РАКА

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к композициям и способам визуализации, обнаружения и лучевой терапии рака. Изобретение, в частности, относится к конъюгированным соединениям, содержащим пептид, нацеленный на рецептор липопротеинов низкой плотности (LDLR), и фармацевтически приемлемый маркер, а также к их применению для мечения, выявления, определения стадии или лечения раковых заболеваний, в частности раковых заболеваний, которые сверхэкспрессируют LDLR.

Уровень техники изобретения

Рак входит в число основных причин заболеваемости и смертности во всем мире: по данным исследования рака проведенном Великобританией и ВОЗ, в 2012 году зафиксировано примерно 14 миллионов новых случаев рака и 8,2 миллиона случаев смерти от рака.

Хотя многие формы рака теперь можно лечить, некоторые из них по-прежнему трудно поддаются лечению. Например, рак поджелудочной железы остается одним из самых смертоносных: 75% смертности в течение первого года и только 6% 5-летней выживаемости. Ежегодно рак поджелудочной железы диагностируют у почти 12 000 человек во Франции и около 340 000 в мире. Ожидается, что этот рак станет второй причиной смерти от рака к 2030 году. Рак поджелудочной железы поражает как мужчин, так и женщин старше 50 лет, и его особенно трудно лечить. Аналогичным образом, мультиформная глиобластома (GBM), наиболее распространенная и наиболее агрессивная злокачественная первичная опухоль головного мозга, является редким, однако опасным для жизни заболеванием. Ежегодно в Европейском Союзе диагностируется около 25 000 новых случаев заболевания (www.pubcan.org/cancer). Это остается важной клинической проблемой, поскольку она плохо реагирует на современные методы лечения. Действительно, сегодня выживаемость через 5 лет составляет около 3%, и, несмотря на значительные успехи в нашем базовом понимании патогенеза опухоли, медианная общая выживаемость пациентов увеличилась всего на 3,3 месяца (с 11,3 до 14,6 месяцев) за последние 25 лет (Patel MA, et al.2014 Sep 29;6(4):1953-85).

Большинство смертельных случаев, наблюдаемых при раке, можно избежать, если будет достигнута ранняя диагностика. Принимая во внимание, что пятилетняя выживаемость для различных видов рака резко падает с каждой стадией опухоли на

момент обнаружения, существует настоятельная необходимость в разработке неинвазивных инструментов визуализации, способных идентифицировать опухоли в самые ранние возможные сроки и идентифицировать пациентов, которые вероятно могут реагировать на терапевтические вмешательства. Смертность и заболеваемость раком могут быть значительно улучшены путем разработки эффективных средств визуализации и терапевтических средств.

Много усилий было предпринято для разработки новых методов ранней и точной диагностики рака. Используются различные методы визуализации, включая позитронную эмиссионную томографию (ПЭТ-сканирование), однофотонную компьютерную томографию (SPECT), рентгеновскую компьютерную томографию (КТ-сканирование), ядерное сканирование, ультразвуковое исследование и магнитно-резонансную томографию (МРТ). Хотя эти технологии визуализации хорошо разработаны, они основаны главным образом на неспецифических, макроскопических и физиологических изменениях анализируемого органа. На сегодняшний день наиболее широко используемым индикатором ПЭТ в онкологии является ^{18}F-FDG, зонд, который измеряет утилизацию глюкозы и является признанным инструментом для диагностики и определения стадии рака. Однако ^{18}F-FDG имеет важные ограничения, включая умеренное поглощение в некоторых опухолях (например, предстательной железе) и повышенное фоновое поглощение в некоторых нормальных тканях (например, головном мозге).

Селективные агенты на основе пептидов, нацеленных на рецепторы, привлекают значительное внимание при молекулярной визуализации опухолевых клеток, которые сверхэкспрессируют соответствующие пептидные рецепторы из-за их уникальных свойств, таких как высокое сродство и специфичность для их мишеней. Действительно, нацеливание на рецептор, который высоко экспрессируется в опухоли, должно обеспечить лучшую диагностику рака, поскольку пептид, нацеленный на рецептор, будет отличать патологию от нормальной ткани.

Что касается лечения рака, было использовано много подходов, по отдельности или в комбинации, таких как химиотерапия, иммунотерапия или лучевая терапия.

Лучевая терапия (также называемая радиотерапией, рентгеновской терапией или облучением) основана на применении ионизирующего излучения для уничтожения раковых клеток и сокращения опухолей. Он используется при широком разнообразии опухолей как для лечебных, так и для паллиативных показаний. Эффекты лучевой терапии локализованы и ограничены областью лечения. Лучевая терапия приводит к повреждению или разрушению клеток в обрабатываемой области («ткани-мишени»),

повреждая их генетический материал, делая невозможным дальнейшее развитие и деление этих клеток. Хотя радиация повреждает как раковые клетки, так и нормальные клетки, большинство нормальных клеток могут восстанавливаться после воздействия радиации и функционировать должным образом. Цель лучевой терапии состоит в том, чтобы повредить как можно больше раковых клеток, ограничивая при этом вред здоровью соседних тканей. Ионизирующее излучение работает, повреждая ДНК раковой ткани, что приводит к гибели клеток.

Существует несколько видов лучевой терапии, среди которых:

- Внешняя лучевая терапия (EBRT), которая является наиболее распространенной формой лучевой терапии. Пациент сидит или лежит на кушетке, а внешний источник ионизирующего излучения направлен на определенную часть тела. Рентгеновские и электронные лучи являются наиболее широко используемыми источниками для лучевой терапии.

- Брахитерапия, при которой закрытый источник излучения помещается внутри или рядом с областью, требующей лечения.

- В лучевой терапии открытого источника (или радионуклидной терапии открытого источника) используются твердые, жидкие, газообразные или другие формы радиоактивных веществ, которые называются радиофармацевтическими препаратами (представляя собой, по существу, радиоактивные лекарственные средства). Они вводятся в организм различными способами (в основном инъекцией или приемом внутрь) и локализуются в определенных местах, органах или тканях в зависимости от их свойств и путей введения. Это включает в себя все, от простого соединения, такого как йодид натрия, который локализуется в щитовидной железе путем захвата йодид-иона, до сложных биофармацевтических препаратов, таких как рекомбинантные антитела, которые присоединяются к радионуклидам и ищут специфические антигены на клеточных поверхностях. Этот метод основан на физических, химических и биологических свойствах радиофармацевтического препарата для лучевой терапии целевых областей организма.

Лучевая терапия имеет несколько побочных эффектов. Характер, тяжесть и длительность побочных эффектов зависят от органов, которые получают облучение, от самого лечения (тип облучения, доза, фракционирование, одновременная химиотерапия) и от состояния пациента. Существуют острые побочные эффекты (тошнота, рвота, кишечный дискомфорт, отек, бесплодие...) и поздние побочные эффекты (фиброз, выпадение волос, сухость, болезни сердца, снижение когнитивных функций...). Следовательно, существует необходимость в разработке направленной лучевой терапии, которая будет вызывать меньше побочных эффектов.

Радионуклидная терапия пептидными рецепторами (PRRT) представляет собой молекулярную терапию (также называемую радиоизотопной терапией), используемую для лечения некоторых видов рака, таких как нейроэндокринная карцинома. В PRRT белок (или пептид), нацеленный на клетки, комбинируется с небольшим количеством радиоактивного материала или радионуклида, создавая специальный тип радиофармацевтического препарата, называемого радиопептидом. При попадании в кровоток пациента этот радиопептид путешествует и связывается со специфическими опухолевыми клетками, доставляя высокую дозу облучения раковой ткани, не затрагивая при этом нормальные ткани.

Существуют явно неудовлетворенные медицинские потребности в области эффективных средств визуализации и нацеливания. Нацеливание на рецептор, который высоко экспрессируется в опухоли, должно обеспечить лучшую диагностику и терапию рака, поскольку пептид, нацеленный на рецептор, будет отличать патологию от нормальной ткани.

Настоящая заявка относится к новым композициям и способам визуализации рака и лучевой терапии на основе агентов, нацеленных на LDLR. Изобретение обеспечивает конъюгированные соединения, которые связывают LDLR и оптимизированы для применения в качестве агентов визуализации или лучевой терапии, и показывает, что такие соединения обеспечивают эффективную, надежную и селективную маркировку раковых клеток со сверхэкспрессией LDLR и являются наиболее подходящими для эффективной диагностики или лучевой терапии таких видов рака.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение предлагает новые композиции и способы для эффективной визуализации, диагностики, обнаружения или лучевой терапии рака, экспрессирующего LDLR. В частности, изобретение относится к конъюгатным соединениям, способным связывать и визуализировать раковые клетки со сверхэкспрессией LDLR. Изобретение позволяет обнаруживать такие виды рака *in vivo*, а также проводить эффективную и селективную лучевую терапию. Изобретение действительно показывает, что конъюгированные агенты по изобретению способны различать раковые и нераковые клетки и могут быть использованы для обеспечения достаточного уровня облучения раковых клеток, не затрагивая при этом здоровые ткани.

Таким образом, одна задача изобретения относится к конъюгированному соединению формулы (I):

M-P (I),

в которой

M представляет собой фармацевтически приемлемый маркер, и

P представляет собой пептид или псевдопептид, имеющий не более 30 аминокислотных остатков и способный связывать LDLR,

для применения в способе мечения и/или выявления раковых клеток у субъекта путем введения конъюгированного соединения субъекту и анализа наличия и/или количества маркера.

Следующую задачу изобретения представляет собой способ маркировки или выявления рака со сверхэкспрессией LDLR у субъекта, включающий (i) введение субъекту соединения формулы (I):

M-P (I),

в которой

M представляет собой фармацевтически приемлемый маркер, и

P представляет собой пептид или псевдопептид, имеющий не более 30 аминокислотных остатков и способный связывать LDLR,

и (ii) анализ наличия и/или количества маркера.

В конкретном варианте осуществления конъюгированное соединение представляет собой мультимерное соединение, содержащее несколько мономеров формулы (I).

Согласно предпочтительным воплощениям M представляет собой радионуклид или флуоресцентный маркер, а P содержит аминокислотную последовательность (II):

A1-Met-A2-Arg-Leu-Arg-A3-A4 (II),

где A1 и A4 независимо представляют собой цистеин или его аналог или изостер, A2 представляет собой пролин или его аналог или изостер, и A3 представляет собой глицин или его аналог или изостер.

Кроме того, M и P могут быть связаны друг с другом либо напрямую, либо спейсером, либо ковалентно, либо посредством нековалентного взаимодействия. В конкретном варианте осуществления M связан с P с применением простетической группы или заключен в оболочку с применением хелатной группы, такой как NODAGA, DOTA, DOTA-GA или NOTA, или их функциональных производных.

Следующая задача изобретения относится к конъюгированному соединению формулы (III):

M-C-S-P (III),

в которой

M представляет собой фармацевтически приемлемый радионуклид,

C представляет собой хелатор, который образует хелат с M,

S представляет собой спейсер, и

P представляет собой пептид или псевдопептид, имеющий не более 30 аминокислотных остатков и способный связывать LDLR.

Следующая задача изобретения относится к композиции, содержащей конъюгированное соединение, как описано выше, а также к ее применению в медицинской визуализации или лучевой терапии.

Следующая задача изобретения представляет собой способ лечения рака, сверхэкспрессирующего LDLR, у субъекта, включающий введение субъекту конъюгированного соединения формулы (III):

M-C-S-P (III),

в которой

M представляет собой фармацевтически приемлемый радионуклид, подходящий для применения в лучевой терапии,

C представляет собой хелатор, который образует хелат с M,

S представляет собой спейсер, и

P представляет собой пептид или псевдопептид, имеющий не более 30 аминокислотных остатков и способный связывать LDLR.

Изобретение может быть использовано для выявления или лечения любого рака с избыточной экспрессией LDLR, такого как рак поджелудочной железы, надпочечников, глиобластома, рак простаты, толстой кишки, печени, поджелудочной железы, яичников, легких или желудка. Оно может быть использовано для любого млекопитающего, такого как человек.

Краткое описание фигур

Фиг. 1: Вестерн-блот, показывающий экспрессию LDLR человека и мыши в различных линиях раковых клеток: (A) CHO95 (линия клеток, которая сверхэкспрессирует LDLR человека при слиянии с eGFP), Hela (рак шейки матки), NCI-H295R (аденокарцинома надпочечников), Capan, BxPC3 и Panc1 (рак поджелудочной железы), MCF-7 и MDA-MB231 (рак молочной железы). На правой панели экспрессию LDLR в линии клеток поджелудочной железы мыши PK4 сравнивают с нормальной поджелудочной железой мыши. (B). Представлены клеточная линия глиобластомы U87MG (две дорожки), клеточная линия рака предстательной железы PC3 и NCI-H295R.

Фиг. 2: Связывание/эндоцитоз конъюгата A (A), конъюгата B (B), конъюгата C (C) и конъюгата D (D) на клетках CHO, экспрессирующих человеческий LDLR, связанный с GFP. Сигнал LDLR-GFP визуализируется в столбце 2, сигнал конъюгата либо непосредственно визуализируется в столбце 4 с применением флуоресценции A680, либо в столбце 3 с применением вторичного антитела, конъюгированного с hFc-A594. Ядра

клеток окрашивали Hoechst в синий цвет, и его сигнал можно визуализировать в столбце 1. Совместную маркировку LDLR-GFP и конъюгатов можно визуализировать как сигнал выделения в столбце 5 на изображении слияния.

Фиг. 3: A – биораспределение ткани конъюгата A в поджелудочной железе, опухоли поджелудочной железы и почках (контроль) у мышей, которым имплантировали опухоль PK4A и вводили в хвостовую вену с конъюгатом A. B – биораспределение ткани конъюгата C в опухоли поджелудочной железы и поджелудочной железы у мышей, которым инъецировали конъюгат C. Биораспределение оценивали с помощью количественного определения ELISA.

Фиг. 4: A – визуализация флуоресценции всего тела мышей, которым имплантировали опухоль PK4A и анализировали через 15 минут, 30 минут, 60 минут и 120 минут после внутривенной инъекции конъюгата C или конъюгата D (контроль). B – визуализация ex-vivo опухоли поджелудочной железы, здоровой поджелудочной железы и печени собирают через 4 часа после внутривенной инъекции конъюгата C или конъюгата D (контроль).

Фиг. 5: Схема реакции для синтеза соединений β-Ala-PEG12-пептид-NH_2 в клетке. В настоящей схеме синтез NODAGA-βAla-PEG12-SEQ ID NO: 1-NH_2 показан в качестве примера.

Фиг. 6: ПЭТ-визуализация мышей, которым вводили ^{18}F-FDG (A), ^{68}Ga-CH44 (B) и ^{68}Ga-CH40 (C) на 14 день после имплантации клеток NCI-H295R. Опухоль надпочечника обозначена кружком.

Фиг. 7: ПЭТ-визуализация мышей, которым вводили ^{68}Ga-CH44 (A) и ^{68}Ga- CH40 (B) на 32 день после имплантации клеток NCI-H295R. Опухоль надпочечника обозначена кружком.

Фиг. 8: ПЭТ-визуализация мышей, которым вводили ^{68}Ga-FG770 (A) и ^{68}Ga-FG769 (B) на 37 день после имплантации клеток NCI-H295R.

Фиг. 9: ПЭТ-визуализация мышей, которым вводили ^{18}F-FDG (A), ^{68}Ga-CH44 (B) и ^{68}Ga-CH40 (C) на 4 день после имплантации клеток Pk4a. Опухоль поджелудочной железы обозначена кружком.

Фиг. 10: ПЭТ-визуализация мышей, которым вводили ^{68}Ga-CH44 (A) и ^{68}Ga- CH40 (B) на 12 день после имплантации клеток Pk4a. Опухоль поджелудочной железы обозначена кружком.

Фиг. 11: ПЭТ-визуализация мышей, которым вводили ^{68}Ga-CH44 на день 14 (A), ^{68}Ga-CH40 на 16 день (B), ^{68}Ga-CH44 на 21 день (C), ^{68}Ga-CH40 на 21 день (D) и ^{68}Ga RGD на 21 день (E) после церебральной имплантации клеток U87MG.

Фиг. 12: Количественная оценка RGD ^{68}Ga-CH44, ^{68}Ga-CH40 и ^{68}Ga-RGD у животных, которым имплантировали U87MG на 21 день, выраженные как соотношение опухоли и контраста.

Фиг. 13: ПЭТ-визуализация мышей, которым вводили ^{68}Ga-CH44 (A) и ^{68}Ga-MG04 (B) на 48 день после имплантации клеток NCI-H295R.

Фиг. 14: Структура соединения VHd.

Подробное описание изобретения

Изобретение относится к композициям и способам визуализации и лучевой терапии рака на основе агентов, нацеленных на LDLR. Изобретение относится к конъюгатным соединениям, содержащим LDLR-связывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый маркер. Более конкретно, изобретение показывает, что такие соединения могут эффективно метить раковые клетки *in vitro* и *in vivo* и обеспечивать их эффективную визуализацию, обнаружение, определение стадий или лучевую терапию.

Более конкретно, задача изобретения представляет собой способ мечения раковых опухолей или опухолей или раковых/опухолевых клеток с применением конъюгированного соединения формулы (I):

M-P (I),

в которой

M представляет собой фармацевтически приемлемый маркер, и

P представляет собой пептид или псевдопептид, имеющий не более 30 аминокислотных остатков и способный связывать рецептор липопротеина низкой плотности (LDLR).

Человеческий LDLR представляет собой трансмембранный белок из 839 аминокислот, включающий три области: внеклеточную область (1-768), трансмембранную область (768-790) и цитоплазматическую область (790-839). Внеклеточная область делится на два субрегиона: область связывания ЛПНП (1-322) и область вне области связывания ЛПНП (322-768). Сообщается, что LDLR экспрессируется большинством ядросодержащих клеток, и общепринято, что от 1000 до 3000 LDLR присутствуют на поверхности непатологических клеток. Количество ЛПНП на раковых клетках может резко возрасти, до 100 000 и более. Опухолевые клетки, о которых сообщается, что они сверхэкспрессируют LDLR, включают клетки рака простаты (*Chen et al., 2001, Int. J. Cancer, 91, 41-45*), рак толстой кишки (*Niendorf et al., 1995, Int. J. Cancer, 61, 461-464*), лейкоз (*Tatidis et al., 2002, Biochem. Pharmacol., 63, 2169-2180*), колоректального рака (*Caruso et al., 2001, Anticancer Res., 21, 429-433*), рака молочной железы (*Graziani et al.,*

2002, Gynecol. Oncol., 85, 493-497), клетки опухоли головного мозга глиобластомы (*Malentiska et al., 2000, Cancer Res., 60, 2300-2303; Nikanjam et al., 2007 Int. J. Pharm., 328, 86-94*), а также клетки рака печени, поджелудочной железы, яичников, легких и желудка. Однако неизвестно, может ли такая повышенная экспрессия влиять на конформацию/доступность рецептора, особенно внеклеточной области 322-768. Действительно, было отмечено, что высокая экспрессия рецепторов может привести к агрегации или конформационным изменениям. Такая агрегация может изменять способность нацеливать агенты на такие клетки, используя нацеливающие на LDLR агенты, которые связывают внеклеточную область 322-768.

Интересно, что, несмотря на повсеместную экспрессию LDLR, конъюгаты по изобретению позволяют эффективно метить клетки, которые сверхэкспрессируют LDLR, особенно раковые клетки, сверхэкспрессирующие LDLR, и обеспечивают эффективное нацеливание на такие экспрессирующие LDLR раковые клетки. Такой эффект могут обуславливать соответствующая плотность рецептора, аффинность связывания конъюгата с LDLR и механизм действия (неконкурентный).

Изобретение показывает, что конъюгаты по изобретению сохраняют способность эффективно связывать LDLR-сверхэкспрессирующие раковые клетки.

Изобретение показывает, что конъюгаты по изобретению могут направлять фармацевтически приемлемые маркеры в клетки со сверхэкспрессией LDLR способом, подходящим для различения таких клеток (например, раковых клеток) от клеток, имеющих регулярные уровни LDLR (например, в нормальной ткани).

Изобретение показывает, что конъюгаты по изобретению могут придавать достаточный уровень мечения для клеток со сверхэкспрессией LDLR, несмотря на плотность LDLR и возможную реорганизацию.

Таким образом, изобретение обеспечивает безопасные и эффективные средства маркировки и лучевой терапии и позволяет разрабатывать эффективные методы диагностики рака и терапевтические методы.

Таким образом, задача изобретения относится к конъюгированному соединению формулы (I):

M-P (I),

в которой

M представляет собой фармацевтически приемлемый маркер, и

P представляет собой пептид или псевдопептид, имеющий не более 30 аминокислотных остатков и способный связывать LDLR,

для применения в способе мечения и/или выявления раковых клеток у субъекта

путем введения конъюгированного соединения субъекту и анализа наличия и/или количества маркера.

Изобретение также относится к способу маркировки, визуализации, диагностики или определения стадии рака у субъекта с применением конъюгатного соединения, как определено выше.

В конкретном варианте осуществления конъюгированные соединения по изобретению дополнительно содержат вторую нацеливающую группу T, которая связывается с молекулой, отличной от LDLR. Примерами таких двойных сопряженных соединений являются соединения приведенной ниже формулы (IV):

M_n-P-T-M_m (IV),

в которой M и P такие, как определено выше, T представляет вторую целевую группу, n равно 1 или 0, m равно 1 или 0. Предпочтительно m + n = 1.

В еще одном конкретном варианте осуществления конъюгированные соединения имеют следующую структуру:

$(M\text{-}C\text{-})_nP\text{-}T(\text{-}C\text{-}M)_m$

в которой M, C и P имеют значения, определенные выше, T представляет вторую нацеливающую группу, n равно 1 или 0, m равно 1 или 0. Предпочтительно m + n = 1.

T может представлять собой любую группу, которая связывается с молекулой-мишенью, отличной от LDLR (или с клеткой, экспрессирующей такую молекулу). Предпочтительно, такая молекула-мишень представляет собой молекулу, экспрессируемую раковыми клетками, такими как раковые клетки поджелудочной железы или раковые клетки предстательной железы, раковые клетки яичников или раковые клетки надпочечников. Примеры такой целевой группы включают, без ограничения, PSMA (простат-специфический мембранный антиген), нейротензин, аналоги соматостатина, а также их производные.

Конъюгаты

Настоящее изобретение раскрывает применение конкретных конъюгатов, нацеленных на LDLR, а также конструкцию новых конъюгатов. Такие конъюгаты могут представлять собой мономеры формулы (I) или мультимерные структуры, как будет описано ниже.

В конкретном варианте осуществления конъюгаты представляют собой соединения формулы M-P (I), как определено выше. Предпочтительно, P содержит аминокислотную последовательность (II):

A1-Met-A2-Arg-Leu-Arg-A3-A4 (II),

в которой A1 и A4 независимо представляют собой цистеин или его аналог или его

изостер, A2 представляет собой пролин или его аналог или его изостер, и A3 представляет собой глицин или его аналог или его изостер.

Более конкретно, в качестве A1 и A4 независимо друг от друга присутствуют аминокислотный остаток, выбранный из цистеина (Cys, C), конфигурации D или L или его производного, выбранного из 2-амино-3-меркаптопропановой кислоты и ее S-замещенных производные, S-ацетилцистеина или 2-амино-3-(ацетилтио)пропановой кислоты, селеноцистеина (Sec, U) или 2-амино-3-(селено)пропановой кислоты, цистеинола, 3-меркаптопропановой кислоты (Mpa) или пенициллamина (Pen) в конфигурации L или D.

В предпочтительном варианте осуществления A1 и A4 выбраны независимо друг от друга из цистеина (Cys), (D)-cys, пенициллamина (Pen) и (D)-пенициллamина ((D)-Pen).

A2 представляет собой более предпочтительно остаток, выбранный из пролина (Pro, P), пирролидин-2-карбоновой кислоты, гомопролина, 2-(2-пирролидинил)этановой кислоты, 3-гидроксипролина (3Hyp), 4-гидроксипролина (4Hyp), 3-метилпролина, 3,4-дегидропролина, 3,4-метанопролина, 4-аминопролина, 4-оксопролина, тиопролина, тиазолидин-4-карбоновой кислоты (Thz), 2-оксотиазолидин-4-карбоновой кислоты, индолин-2-карбоновой кислоты (Idc), пипеколиновой кислоты (Pip), пиперидин-2-карбоновой кислоты, нипекотиновой кислоты (Nip), пиперидин-3-карбоновой кислоты, 4-оксопипеколиновой кислоты, 4-гидроксипипеколиновой кислоты, амино-1-циклогексанкарбоновой кислоты или пролинола.

В предпочтительном варианте осуществления A2 выбран из пролина, пипеколиновой кислоты (Pip) или тиазолидин-4-карбоновой кислоты (Thz).

A3 представляет собой более предпочтительно остаток, выбранный из глицина (Gly, G), 2-аминоэтановой кислоты, саркозина (Sar), N-метилглицина (MeGly), N-этилглицина (EtGly), аллилглицина (allylGly), 2-аминопента-4-еновой кислоты, 2-циклопентилглицина (Cpg), 2-циклогексилглицина (Chg), 2,2-дипропилглицина (Dpg), 2-(3-индолил)глицина (IndGly), 2-инданилглицина (Igl), 2-неопентилглицина (Npt), 2-октилглицина (OctGly), 2-пропаргилглицина (Pra) или 2-амино-пент-4-иновой кислоты, 2-фенилглицина (Phg), 2-(4-хлорфенил)глицина, азаглицина (AzGly), глицинола или 2 - аминоэтанола.

В предпочтительном варианте осуществления A3 представляет собой глицин или саркозин.

В предпочтительном варианте осуществления P содержит или состоит по существу или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из представленных ниже SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 9:

SEQ ID NO: 1, (D)-Cys-Met-Thz-Arg-Leu-Arg-Gly-Pen;

SEQ ID NO: 2, (D)-Cys-Met-Thz-Arg-Leu-Arg-Sar-Pen;

SEQ ID NO: 3, (D)-Cys-Met-Pip-Arg-Leu-Arg-Sar-Cys;

SEQ ID NO: 4, (D)-Cys-Met-Pip-Arg-Leu-Arg-Gly-Pen;

SEQ ID NO: 5, (D)-Cys-Met-Pip-Arg-Leu-Arg-Sar-Pen;

SEQ ID NO: 6, Cys-Met-Pro-Arg-Leu-Arg-Gly-Cys;

SEQ ID NO: 7, (D)-Cys-Met-Pro-Arg-Leu-Arg-Gly-Cys;

SEQ ID NO: 8, Asp-Ser-Gly-Leu-Cys-Met-Pro-Arg-Leu-Arg-Gly-Cys-Asp-Pro-Arg;

SEQ ID NO: 9, (D)-Pen-Met-Thz-Arg-Leu-Arg-Gly-Cys.

Результаты, полученные авторами изобретения, показывают, что конъюгаты по изобретению обладают улучшенным сродством (KD) к LDLR по сравнению с скремблированным пептидом, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 или 14 (см. Пример 3). Кроме того, конъюгаты по изобретению демонстрируют лучшее накопление в опухоли поджелудочной железы по сравнению со здоровой поджелудочной железой (см. Пример 4). В частности, как показано в примерах, маркировка раковой ткани может в 10-50 раз превосходить маркировку нераковой ткани. Такой уровень накопления вполне достаточен для обеспечения надежного и четкого различения изображений. Кроме того, это означает, что в случае применения в лучевой терапии конъюгат обладает очень хорошей специфичностью к опухолевым клеткам по сравнению со здоровыми клетками.

Как обсуждалось выше, маркер M может представлять собой любой радионуклидный или флуоресцентный маркер.

Флуоресцентные маркеры, которые можно использовать, представляют собой, например, Alexa Fluor 680, CF680, ATTO680, Fluoroprobes682, Cyanine 5.5, IRDye 680 или Vivotag. В общем случае все ближние инфракрасные (ИК) флуоресцентные маркеры можно использовать для визуализации, поскольку они обеспечивают минимальную автофлуоресценцию ткани. В частности, Alexa Fluor 680 представляет собой яркий и фотостабильный краситель ближнего ИК-диапазона, который спектрально похож на краситель Cy5.5. Используемый для стабильной генерации сигналов при визуализации и проточной цитометрии, краситель Alexa Fluor 680 является водорастворимым и нечувствительным к pH в диапазоне от pH 4 до pH 10. Эфир NHS (или сукцинимидиловый эфир) Alexa Fluor 680 является наиболее популярным средством для конъюгирования этого красителя к белку или антителу. NHS сложный эфир красителей может быть использован для маркировки первичных аминов ($R\text{-}NH_2$) белков, модифицированных амином олигонуклеотидов и других аминосодержащих молекул.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления M представляет собой

радионуклид, адаптированный для применения в медицинских изображениях, например, для применения в изображениях с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), сцинтиграфии, позитронно-эмиссионной томографии или компьютерной томографии с однофотонной эмиссией. Предпочтительно M представляет собой радионуклид, адаптированный для применения в ПЭТ.

Примеры радионуклидов, подходящих для применения в настоящем изобретении, включают, без ограничения, ^{18}F, ^{11}C, ^{15}O, ^{13}N, ^{68}Ga, ^{82}Rb и ^{89}Zr. Предпочтительные радионуклиды для применения в изображениях должны иметь короткий период полураспада (например, от 30 минут до 3 или 4 дней) и низкоэнергетическое излучение (например, менее чем гамма-излучающие радионуклиды с энергией 300 кэВ). Предпочтительно, радионуклид составляет ^{68}Ga. ^{68}Ga имеет короткий период полураспада (68 минут) и представляет собой позитрон-излучающий изотоп.

Для применения в лучевой терапии радионуклиды обычно представляют собой бета- или высокоэнергетические гамма-излучающие радионуклиды, предпочтительно с более длительным периодом полураспада (например, от 1 до 75 дней). Предпочтительные радионуклиды для применения в лучевой терапии выбраны из ^{90}Y, ^{111}In, ^{131}I и ^{177}Lu. В предпочтительном варианте используют ^{90}Y, ^{177}Lu или ^{111}In.

Конъюгаты по изобретению можно синтезировать любым способом, известным специалисту в данной области (химический, биологический или генетический синтез и т.д.). Для химического синтеза коммерческие аппараты, которые могут включать природные, а также неприродные аминокислоты, такие как D-энантиомеры и остатки с боковыми цепями с гидрофобностью и стерическими препятствиями, отличными от таковых у их природных гомологов (так называемые экзотические, то есть некодируемые аминокислоты) или пептидная последовательность, содержащая одну или несколько пептидомиметических связей, которые могут включать, в частности, интеркалирование метиленовой ($-CH_2-$) или фосфатной ($-PO_2-$) группы, вторичного амина (-NH-) или кислорода (-O-) или N-алкилпептида. Пептиды или псевдопептиды или их белковая часть также могут быть получены из последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей их. Эти последовательности нуклеиновой кислоты могут представлять собой ДНК или РНК и могут быть объединены с контрольными последовательностями и/или встроены в векторы биологической экспрессии.

В конъюгированных соединениях по изобретению соединение между M и P (и/или между P и T) может быть осуществлено любым приемлемым способом связывания с учетом химической природы, обструкции и количества ассоциированных агентов. Таким образом, связывание может осуществляться одной или несколькими ковалентными,

ионными, водородными, гидрофобными или ван-дер-ваальсовыми связями. Кроме того, связывание может быть осуществлено в любом сайте пептида или псевдопептида, где функциональные группы, такие как -OH, -SH, $-CO_2H$, $-NH_2$, $-SO_3H$, -CN, $-N_3$, -NCS, $-PO_2H$, алкин, малеимидный или сукцинимидный сложный эфир, присутствуют в природе или были введены. Таким образом, M может быть связан (соединен) с пептидом или псевдопептидом ковалентной связью либо на N-конце, либо на C-конце, у реакционноспособных групп, которые несут боковые цепи природных или неприродных аминокислот этого пептидная последовательность или через протезную группу. Аналогичным образом, связывание может быть осуществлено в любом месте визуализирующего или радиотерапевтического агента.

Предпочтительно, чтобы взаимодействие было достаточно сильным, чтобы M не отделялось от пептида до того, как он достигнет своего места действия, и чтобы M и пептид оставались связанными в течение времени, необходимого для осуществления способа визуализации или для того, чтобы M имел терапевтическое воздействие. По этой причине предпочтительным сочетанием по изобретению является ковалентное или ионное связывание. Визуализирующий или радиотерапевтический агент может быть связан непосредственно с пептидом либо на одном из его концов (N-конец или C-конец), либо в боковой цепи одной из составляющих аминокислот последовательности. Визуализирующий или радиотерапевтический агент также может быть связан косвенно с помощью линкера или спейсера, либо на одном из концевых концов пептидов, либо на боковой цепи одной из конститутивных аминокислот последовательности. В конкретном варианте осуществления M связан с пептидом путем инкапсулирования с использованием, например, хелатирующего агента.

В этом отношении в предпочтительном варианте осуществления конъюгированное соединение содержит хелатор C, способный образовывать хелат с M. Такие конъюгаты имеют структуру M-C-P. Могут быть использованы различные хелаторы. Предпочтительно, в качестве C могут быть выбраны NODAGA (1,4,7-триазациклононан-1-глутаровая кислота-4,7-диуксусная кислота), DOTA (тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота), NOTA (1,4,7-триазациклононан-триуксусная кислота), DOTA-GA (2,2',2''-(10-(2,6-диоксотетрагидро-2H-пиран-3-ил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан)-1,4,7-триил)триуксусная кислота) и их функциональные производные. NODAGA и NOTA являются предпочтительными для визуализации, в то время как DOTA является предпочтительным для лучевой терапии.

Термин «функциональные производные» означает любое соединение, полученное из вышеупомянутых хелаторов, путем замены одной или нескольких его функциональных

групп (то есть групп, участвующих в хелатирующей функции) другой функциональной группой без ущерба для указанной хелатирующей функции и/или путем добавления и/или удаления групп, не вовлеченных в хелатную функцию, без ущерба для указанной хелатирующей функции.

Хелатор C может быть связан непосредственно с пептидом P (или с T) или через спейсер S, обычно ковалентно связанный с P и C (или с T и C). В этом отношении в конкретном варианте осуществления конъюгаты содержат структуру MCP, где M, C и P имеют значения, определенные выше, и где C связан непосредственно с пептидом P. В другом конкретном варианте осуществления конъюгаты содержат структуру MCSP, где M, C, S и P являются такими, как определено выше. В дополнительном конкретном варианте осуществления конъюгаты содержат структуру M-C-P-T или P-T-C-M или M-C-S-P-T или P-T-S-C-M, где M, C, S, P и T имеют значения, определенные выше. В дополнительном варианте осуществления P и T связаны через спейсерную азогруппу.

S может быть выбран из би- или многофункциональных агентов алкильной, арильной, ПЭГ или пептидной природы и имеющих на своих концах функциональные группы, такие как амины, сложные эфиры, альдегиды, алкильные или арильные кислоты, ангидридные, сульфгидрильные или карбоксильные группы, группы, полученные из цианогенбромида или хлорида, карбонилдиимидазол, сложные эфиры сукцинимидов, сульфоногалогениды, малеимиды, азид, изотиоцианат, алкины. В конкретном варианте осуществления S содержит один или несколько ПЭГ, предпочтительно с бета-аланином на одном его конце. Например, S представляет собой олигомер из двенадцати ПЭГ с бета-аланином на одном конце цепи. В другом варианте осуществления S содержит несколько остатков Gly, таких как G3 или G4S. В других конкретных вариантах осуществления S включает гидрофильные отрицательно заряженные пептидные последовательности, охватывающие аминокислоты конфигурации D или L, такие как несколько повторяющихся единиц His-Glu (2 или 3 единицы), или гидрофильные нейтральные последовательности, охватывающие аминокислоты конфигурации D или L, такие как Gly-Gly-Gly-Arg-Asp-Asn. В другом варианте осуществления метаболизируемые группы, стабильные в плазме, но специфически расщепляемые в почках гидролазами на пограничной мембране проксимальной трубчатой кисти, могут быть использованы для уменьшения задержки в почках. Например, можно использовать глицил-лизиновую связь. Таким образом, S может представлять собой любой фармакокинетический модификатор.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к сопряженным соединениям формулы (III):

M-C-S-P (III),

в которой

M представляет собой фармацевтически приемлемый радионуклид,

C представляет собой хелатор, который образует хелат с M,

S представляет собой спейсер, и

P представляет собой пептид или псевдопептид, имеющий не более 30 аминокислотных остатков и способный связывать рецептор липопротеина низкой плотности (LDLR).

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгированным соединениям, как определено выше, которые дополнительно содержат вторую нацеливающую группу T.

Предпочтительные конъюгированные соединения по изобретению представляют собой соединения формулы (III), где

M представляет собой фармацевтически приемлемый радионуклид,

C выбран из NODAGA, DOTA, NOTA и DOTA-GA,

S представляет собой спейсер, включающий бифункциональный агент, PEG или пептид, или S отсутствует, и

P представляет собой пептид или псевдопептид, имеющий не более 30 аминокислотных остатков и способный связывать рецептор липопротеина низкой плотности (LDLR).

В наиболее предпочтительных соединениях по изобретению C представляет собой NODAGA или DOTA, а P содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-9.

Конкретные примеры конъюгированных соединений по изобретению включают:

^{68}Ga-NODAGA-SEQ ID NO: 1,

^{68}Ga-NOTA-SEQ ID NO: 1,

^{68}Ga-DOTA-SEQ ID NO: 1,

^{68}Ga-DOTA-GA-SEQ ID NO: 1,

^{18}F-NODAGA-SEQ ID NO: 1,

^{18}F-NOTA-SEQ ID NO: 1,

^{18}F-DOTA-SEQ ID NO: 1,

^{18}F-DOTA-GA-SEQ ID NO: 1,

^{90}Y-NODAGA-SEQ ID NO: 1,

^{90}Y-NOTA-SEQ ID NO: 1,

^{90}Y-DOTA-SEQ ID NO: 1,

^{90}Y-DOTA-GA-SEQ ID NO: 1,

^{111}In-NODAGA-SEQ ID NO: 1,

^{111}In-NOTA-SEQ ID NO: 1,

^{111}In-DOTA-SEQ ID NO: 1,

^{111}In-DOTA-GA-SEQ ID NO: 1,

^{177}Lu-NODAGA-SEQ ID NO: 1,

^{177}Lu-NOTA-SEQ ID NO: 1,

^{177}Lu-DOTA-SEQ ID NO: 1,

^{177}Lu-DOTA-GA-SEQ ID NO: 1,

^{68}Ga-NODAGA-SEQ ID NO: 2,

^{68}Ga-NOTA-SEQ ID NO: 2,

^{68}Ga-DOTA-SEQ ID NO: 2,

^{68}Ga-DOTA-GA-SEQ ID NO: 2,

^{18}F-NODAGA-SEQ ID NO: 2,

^{18}F-NOTA-SEQ ID NO: 2,

^{18}F-DOTA-SEQ ID NO: 2,

^{18}F-DOTA-GA-SEQ ID NO: 2,

^{90}Y-NODAGA-SEQ ID NO: 2,

^{90}Y-NOTA-SEQ ID NO: 2,

^{90}Y-DOTA-SEQ ID NO: 2,

^{90}Y-DOTA-GA-SEQ ID NO: 2,

^{111}In-NODAGA-SEQ ID NO: 2,

^{111}In-NOTA-SEQ ID NO: 2,

^{111}In-DOTA-SEQ ID NO: 2,

^{111}In-DOTA-GA-SEQ ID NO: 2,

^{177}Lu-NODAGA-SEQ ID NO: 2,

^{177}Lu-NOTA-SEQ ID NO: 2,

^{177}Lu-DOTA-SEQ ID NO: 2,

^{177}Lu-DOTA-GA-SEQ ID NO: 2,

^{68}Ga-NODAGA-SEQ ID NO: 3,

^{68}Ga-NOTA-SEQ ID NO: 3,

^{68}Ga-DOTA-SEQ ID NO: 3,

^{68}Ga-DOTA-GA-SEQ ID NO: 3,

^{18}F-NODAGA-SEQ ID NO: 3,

^{18}F-NOTA-SEQ ID NO: 3,

^{18}F-DOTA-SEQ ID NO: 3,

^{18}F-DOTA-GA-SEQ ID NO: 3,

^{90}Y-NODAGA-SEQ ID NO: 3,

^{90}Y-NOTA-SEQ ID NO: 3,

^{90}Y-DOTA-SEQ ID NO: 3,

^{90}Y-DOTA-GA-SEQ ID NO: 3,

^{111}In-NODAGA-SEQ ID NO: 3,

^{111}In-NOTA-SEQ ID NO: 3,

^{111}In-DOTA-SEQ ID NO: 3,

^{111}In-DOTA-GA-SEQ ID NO: 3,

^{177}Lu-NODAGA-SEQ ID NO: 3,

^{177}Lu-NOTA-SEQ ID NO: 3,

^{177}Lu-DOTA-SEQ ID NO: 3,

^{177}Lu-DOTA-GA-SEQ ID NO: 3,

^{68}Ga-NODAGA-SEQ ID NO: 4,

^{68}Ga-NOTA-SEQ ID NO: 4,

^{68}Ga-DOTA-SEQ ID NO: 4,

^{68}Ga-DOTA-GA-SEQ ID NO: 4,

^{18}F-NODAGA-SEQ ID NO: 4,

^{18}F-NOTA-SEQ ID NO: 4,

^{18}F-DOTA-SEQ ID NO: 4,

^{18}F-DOTA-GA-SEQ ID NO: 4,

^{90}Y-NODAGA-SEQ ID NO: 4,

^{90}Y-NOTA-SEQ ID NO: 4,

^{90}Y-DOTA-SEQ ID NO: 4,

^{90}Y-DOTA-GA-SEQ ID NO: 4,

^{111}In-NODAGA-SEQ ID NO: 4,

^{111}In-NOTA-SEQ ID NO: 4,

^{111}In-DOTA-SEQ ID NO: 4,

^{111}In-DOTA-GA-SEQ ID NO: 4,

^{177}Lu-NODAGA-SEQ ID NO: 4,

^{177}Lu-NOTA-SEQ ID NO: 4,

^{177}Lu-DOTA-SEQ ID NO: 4,

^{177}Lu-DOTA-GA-SEQ ID NO: 4,

^{68}Ga-NODAGA-SEQ ID NO: 5,

^{68}Ga-NOTA-SEQ ID NO: 5,

^{68}Ga-DOTA-SEQ ID NO: 5,

^{68}Ga-DOTA-GA-SEQ ID NO: 5,

^{18}F-NODAGA-SEQ ID NO: 5,

^{18}F-NOTA-SEQ ID NO: 5,

^{18}F-DOTA-SEQ ID NO: 5,

^{18}F-DOTA-GA-SEQ ID NO: 5,

^{90}Y-NODAGA-SEQ ID NO: 5,

^{90}Y-NOTA-SEQ ID NO: 5,

^{90}Y-DOTA-SEQ ID NO: 5,

^{90}Y-DOTA-GA-SEQ ID NO: 5,

^{111}In-NODAGA-SEQ ID NO: 5,

^{111}In-NOTA-SEQ ID NO: 5,

^{111}In-DOTA-SEQ ID NO: 5,

^{111}In-DOTA-GA-SEQ ID NO: 5,

^{177}Lu-NODAGA-SEQ ID NO: 5,

^{177}Lu-NOTA-SEQ ID NO: 5,

^{177}Lu-DOTA-SEQ ID NO: 5,

^{177}Lu-DOTA-GA-SEQ ID NO: 5,

^{68}Ga-NODAGA-SEQ ID NO: 6,

^{68}Ga-NOTA-SEQ ID NO: 6,

^{68}Ga-DOTA-SEQ ID NO: 6,

^{68}Ga-DOTA-GA-SEQ ID NO: 6,

^{18}F-NODAGA-SEQ ID NO: 6,

^{18}F-NOTA-SEQ ID NO: 6,

^{18}F-DOTA-SEQ ID NO: 6,

^{18}F-DOTA-GA-SEQ ID NO: 6,

^{90}Y-NODAGA-SEQ ID NO: 6,

^{90}Y-NOTA-SEQ ID NO: 6,

^{90}Y-DOTA-SEQ ID NO: 6,

^{90}Y-DOTA-GA-SEQ ID NO: 6,

^{111}In-NODAGA-SEQ ID NO: 6,

^{111}In-NOTA-SEQ ID NO: 6,

^{111}In-DOTA-SEQ ID NO: 6,

^{111}In-DOTA-GA-SEQ ID NO: 6,

^{177}Lu-NODAGA-SEQ ID NO: 6,

^{177}Lu-NOTA-SEQ ID NO: 6,

^{177}Lu-DOTA-SEQ ID NO: 6,

^{177}Lu-DOTA-GA-SEQ ID NO: 6

и

^{68}Ga-NODAGA-S-SEQ ID NO: 1,

^{68}Ga-NOTA-S-SEQ ID NO: 1,

^{68}Ga-DOTA-S-SEQ ID NO: 1,

^{68}Ga-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 1,

^{18}F-NODAGA-S-SEQ ID NO: 1,

^{18}F-NOTA-S-SEQ ID NO: 1,

^{18}F-DOTA-S-SEQ ID NO: 1,

^{18}F-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 1,

^{90}Y-NODAGA-S-SEQ ID NO: 1,

^{90}Y-NOTA-S-SEQ ID NO: 1,

^{90}Y-DOTA-S-SEQ ID NO: 1,

^{90}Y-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 1,

^{111}In-NODAGA-S-SEQ ID NO: 1,

^{111}In-NOTA-S- SEQ ID NO: 1,

^{111}In-DOTA-S-SEQ ID NO: 1,

^{111}In-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 1,

^{177}Lu-NODAGA-S-SEQ ID NO: 1,

^{177}Lu-NOTA-S-SEQ ID NO: 1,

^{177}Lu-DOTA-S-SEQ ID NO: 1,

^{177}Lu-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 1,

^{68}Ga-NODAGA-S-SEQ ID NO: 2,

^{68}Ga-NOTA-S-SEQ ID NO: 2,

^{68}Ga-DOTA-S-SEQ ID NO: 2,

^{68}Ga-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 2,

^{18}F-NODAGA-S-SEQ ID NO: 2,

^{18}F-NOTA-S-SEQ ID NO: 2,

^{18}F-DOTA-S-SEQ ID NO: 2,

^{18}F-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 2,

^{90}Y-NODAGA-S-SEQ ID NO: 2,

^{90}Y-NOTA-S-SEQ ID NO: 2,

^{90}Y-DOTA-S-SEQ ID NO: 2,

^{90}Y-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 2,

^{111}In-NODAGA-S-SEQ ID NO: 2,

^{111}In-NOTA-S- SEQ ID NO: 2,

^{111}In-DOTA-S-SEQ ID NO: 2,

^{111}In-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 2,

^{177}Lu-NODAGA-S-SEQ ID NO: 2,

^{177}Lu-NOTA-S-SEQ ID NO: 2,

^{177}Lu-DOTA-S-SEQ ID NO: 2,

^{177}Lu-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 2,

^{68}Ga-NODAGA-S-SEQ ID NO: 3,

^{68}Ga-NOTA-S-SEQ ID NO: 3,

^{68}Ga-DOTA-S-SEQ ID NO: 3,

^{68}Ga-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 3,

^{18}F-NODAGA-S-SEQ ID NO: 3,

^{18}F-NOTA-S-SEQ ID NO: 3,

^{18}F-DOTA-S-SEQ ID NO: 3,

^{18}F-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 3,

^{90}Y-NODAGA-S-SEQ ID NO: 3,

^{90}Y-NOTA-S-SEQ ID NO: 3,

^{90}Y-DOTA-S-SEQ ID NO: 3,

^{90}Y-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 3,

^{111}In-NODAGA-S-SEQ ID NO: 3,

^{111}In-NOTA-S- SEQ ID NO: 3,

^{111}In-DOTA-S-SEQ ID NO: 3,

^{111}In-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 3,

^{177}Lu-NODAGA-S-SEQ ID NO: 3,

^{177}Lu-NOTA-S-SEQ ID NO: 3,

^{177}Lu-DOTA-S-SEQ ID NO: 3,

^{177}Lu-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 3,

^{68}Ga-NODAGA-S-SEQ ID NO: 4,

^{68}Ga-NOTA-S-SEQ ID NO: 4,

^{68}Ga-DOTA-S-SEQ ID NO: 4,

^{68}Ga-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 4,

^{18}F-NODAGA-S-SEQ ID NO: 4,

^{18}F-NOTA-S-SEQ ID NO: 4,

^{18}F-DOTA-S-SEQ ID NO: 4,

^{18}F-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 4,

^{90}Y-NODAGA-S-SEQ ID NO: 4,

^{90}Y-NOTA-S-SEQ ID NO: 4,

^{90}Y-DOTA-S-SEQ ID NO: 4,

^{90}Y-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 4,

^{111}In-NODAGA-S-SEQ ID NO: 4,

^{111}In-NOTA-S- SEQ ID NO: 4,

^{111}In-DOTA-S-SEQ ID NO: 4,

^{111}In-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 4,

^{177}Lu-NODAGA-S-SEQ ID NO: 4,

^{177}Lu-NOTA-S-SEQ ID NO: 4,

^{177}Lu-DOTA-S-SEQ ID NO: 4,

^{177}Lu-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 4,

^{68}Ga-NODAGA-S-SEQ ID NO: 5,

^{68}Ga-NOTA-S-SEQ ID NO: 5,

^{68}Ga-DOTA-S-SEQ ID NO: 5,

^{68}Ga-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 5,

^{18}F-NODAGA-S-SEQ ID NO: 5,

^{18}F-NOTA-S-SEQ ID NO: 5,

^{18}F-DOTA-S-SEQ ID NO: 5,

^{18}F-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 5,

^{90}Y-NODAGA-S-SEQ ID NO: 5,

^{90}Y-NOTA-S-SEQ ID NO: 5,

^{90}Y-DOTA-S-SEQ ID NO: 5,

^{90}Y-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 5,

^{111}In-NODAGA-S-SEQ ID NO: 5,

^{111}In-NOTA-S- SEQ ID NO: 5,

^{111}In-DOTA-S-SEQ ID NO: 5,

^{111}In-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 5,

^{177}Lu-NODAGA-S-SEQ ID NO: 5,

^{177}Lu-NOTA-S-SEQ ID NO: 5,

^{177}Lu-DOTA-S-SEQ ID NO: 5,

^{177}Lu-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 5,

^{68}Ga-NODAGA-S-SEQ ID NO: 6,

^{68}Ga-NOTA-S-SEQ ID NO: 6,

^{68}Ga-DOTA-S-SEQ ID NO: 6,

^{68}Ga-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 6,

^{18}F-NODAGA-S-SEQ ID NO: 6,

^{18}F-NOTA-S-SEQ ID NO: 6,

^{18}F-DOTA-S-SEQ ID NO: 6,

^{18}F-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 6,

^{90}Y-NODAGA-S-SEQ ID NO: 6,

^{90}Y-NOTA-S-SEQ ID NO: 6,

^{90}Y-DOTA-S-SEQ ID NO: 6,

^{90}Y-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 6,

^{111}In-NODAGA-S-SEQ ID NO: 6,

^{111}In-NOTA-S- SEQ ID NO: 6,

^{111}In-DOTA-S-SEQ ID NO: 6,

^{111}In-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 6,

^{177}Lu-NODAGA-S-SEQ ID NO: 6,

^{177}Lu-NOTA-S-SEQ ID NO: 6,

^{177}Lu-DOTA-S-SEQ ID NO: 6,

^{177}Lu-DOTA-GA-S-SEQ ID NO: 6

где S представляет собой спейсер, как определено выше.

В конкретном варианте осуществления конъюгированные соединения по изобретению могут быть в мультимерной форме, то есть содержать несколько копий группы P или M или обоих. Более конкретно, конъюгированные соединения могут содержать структуру M-P-X_i-P_j-M_k, в которой M и P имеют значения, определенные выше, X представляет собой сшивающий агент, i представляет собой целое число, выбранное из 0 или 1, j представляет собой целое число, выбранное из 0, 1, 2, 3, 4 или 5, и k является целым числом, выбранным из 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В таких мультимерных структурах, когда i = 0, j и k обычно также равны до 0. Кроме того, k может быть равно или ниже j. Также в таких мультимерных структурах M может быть связан с P, как определено выше (то есть либо непосредственно, либо с использованием хелатора и/или спейсера).

Конкретные примеры таких мультимерных соединений имеют структуру M-P-X_i-P_j-M_k, в которой M и P являются такими, как определено выше, X представляет собой сшивающий агент, j равно 1 и k равно 0.

Сшивающий агент X может представлять собой любую химическую сшивающую группу, совместимую для использования в фармацевтической или ветеринарной области.

Группа предпочтительно лишена биологической активности и токсичности. Размер сшивающего агента может быть отрегулирован специалистом в данной области. Предпочтительными примерами X-групп являются полилизиновые или полиглутаминовые платформы (линейные, циклизованные или разветвленные блоки) или многофункциональные органические соединения, такие как PEG (3) -пентример-G1-(NH_2+4xN_3)*4HCl с одной аминогруппой и четырьмя азидными группами. В конкретном варианте осуществления сшивающий агент содержит, по меньшей мере, две реакционноспособные функциональные группы, предпочтительно, по меньшей мере, три функциональные группы, что позволяет связывать, по меньшей мере, 2 пептида. Примеры реакционноспособных функциональных групп включают, например, амины, кислоты, тиолы, азиды, алкины, карбонилы или гидразины. Пептиды могут быть связаны с X либо напрямую, либо через ковалентную связь с реакционноспособной функциональной группой агента, либо через спейсер, который может состоять, например, из глицина или ряда глицина, молекулы PEG или аминогексановой кислоты.

Конкретный пример такого мультимерного соединения по изобретению представляет собой соединение VHd, которое иллюстрирует фиг. 14:

DOTA-PEG2-E(PEG2-SEQ ID NO:1)-PEG2-E(PEG2-SEQ ID NO:1)-NH_2.

Изобретение также относится к любому из указанных выше конъюгированных соединений, не содержащих маркерную группу M. Такие соединения представляют собой промежуточные соединения при получении конечных меченых конъюгированных соединений. Действительно, как показано в примерах, конъюгаты сначала готовят, а маркировку проводят впоследствии, обычно перед введением. Таким образом, изобретение также относится к любому конъюгату, как определено выше, который лишен M. Изобретение, в частности, относится к соединениям структуры C-(S-)$_n$P, в которой C, S, P и n определены и связаны, как определено выше, а также в качестве его вариантов, включающих T-группу и/или их мультимеры, как дополнительно определено выше.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно конъюгированное соединение, как определено выше. Композиция может содержать один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей или разбавителей.

Изобретение также относится к диагностической композиции, отличающейся тем, что она содержит диагностический или медицинский визуализирующий агент, состоящий из соединения конъюгата, такого как определено выше.

Применение для визуализации/диагностики

Конъюгаты по изобретению можно использовать для маркировки, выявления или

диагностики видов LDLR-экспрессирующего рака *in vivo*, у любого млекопитающего, в частности, у человека.

В этом отношении в конкретном варианте осуществления M представляет собой радионуклидный или флуоресцентный краситель, адаптированный для использования в изображениях, и способ маркировки и/или обнаружения включает:

a) введение конъюгированного соединения субъекту,

b) выполнение метода визуализации, и

c) анализ сигнала, полученного на этапе b),

где наличие сигнала указывает на наличие раковых клеток и/или стадии развития рака у указанного субъекта.

Конъюгат можно вводить различными путями. Предпочтительно, конъюгат вводят путем системного, парентерального или местного введения. В частности, инъекция может быть внутривенной, подкожной, внутримышечной, внутриартериальной или внутриопухолевой. В конкретном варианте осуществления конъюгированное соединение по изобретению вводят внутривенно. Такой способ введения обеспечивает правильную диффузию соединения в организме и достижение интересующей ткани. В другом варианте осуществления введение осуществляется внутриопухолевой инъекцией. Такой режим подходит, когда наличие опухоли известно или сильно подозревается, и, например, выполняется метод для определения стадии опухоли, оценки ее прогрессирования или эффективности лечения.

Количество вводимого соединения может быть отрегулировано специалистом в зависимости от цели способа (визуализация, обнаружение, мониторинг) и субъекта.

Соединения по изобретению могут использоваться в различных методах визуализации, хорошо известных в данной области техники, таких как, без ограничения, сцинтиграфия, позитронно-эмиссионная томография (PET), позитронно-эмиссионная томография (PET CT) или однофотонная эмиссионная компьютерная эмиссионная томография (SPECT). Предпочтительный метод представляет собой ПЭТ.

В зависимости от метода полученный сигнал может представлять собой количественное значение маркера, изображение, кривую распределения, число событий аннигиляции позитронов и т.д. На этапе c) такой сигнал анализируется для определения наличия, стадии или развития рак у субъекта. Термин «анализ» относится к любому методу, который позволяет определить, соответствует ли сигнал нормальному сигналу или нет. Анализы могут быть не только визуальными, но и включать количественные анализы. Анализ может включать в себя этапы сравнения значения сигнала, полученного с помощью изображений, со значением сигнала известной здоровой ткани того же субъекта

или другого субъекта. Значение сигнала также можно сравнить с контрольным значением.

Значение, полученное на этапе b), более важное, чем контрольное значение или контроль из здоровой ткани, указывает на присутствие раковых клеток. Стадия развития рака может быть оценена путем сравнения у одного и того же субъекта сигнала, полученного после двух разных сеансов визуализации, разнесенных во времени.

Конъюгированные соединения по изобретению особенно приспособлены для мечения и/или выявления раковых клеток, которые сверхэкспрессируют LDLR. В этом отношении термин «клетки, которые сверхэкспрессируют LDLR» относится к клеткам, которые экспрессируют по меньшей мере на 10% больше LDLR относительно стандартного уровня экспрессии. Обычно от 1000 до 3000 LDLR присутствуют на поверхности «нормальных» клеток. Сверхэкспрессирующие LDLR клетки представляют собой клетки, которые экспрессируют, по меньшей мере, на 20% больше LDLR, более конкретно, по меньшей мере, на 50%, 75%, 100% или на 150% больше LDLR.

Конкретные примеры рака со сверхэкспрессией LDLR, который можно обнаружить с использованием настоящего способа, включают рак поджелудочной железы, рак надпочечника, глиобластому, рак простаты, рак толстой кишки, рак печени, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак легких или рак желудка.

Лучевая терапия

В дополнительном аспекте изобретение также относится к применению конъюгированных соединений по изобретению для лечения рака посредством лучевой терапии.

Термины «лечение», «лечащий», «лечить» и другие подобные выражения относятся к получению фармакологического и/или физиологического эффекта, например, ингибирования роста раковых клеток или улучшения гибели раковых клеток.

В связи с этим способ лечения включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, конъюгированного соединения, как определено выше.

Предпочтительно, конъюгированное соединение содержит радионуклид, подходящий для лучевой терапии, такой как бета- или высокоэнергетические гамма-излучающие радионуклиды, предпочтительно с длительным периодом полураспада (например, от 1 до 75 дней). Предпочтительные радионуклиды для использования в лучевой терапии выбраны из ^{90}Y, ^{111}In, ^{131}I и ^{177}Lu. В предпочтительном варианте используют ^{90}Y, ^{177}Lu или ^{111}In.

Конъюгат можно вводить различными путями. Предпочтительно, конъюгат применяют путем системного, парентерального или местного введения. В частности, инъекция может быть внутривенной, подкожной, внутримышечной, внутриартериальной

или внутриопухолевой. В конкретном варианте осуществления конъюгированное соединение по изобретению вводят внутривенно. Такой способ введения обеспечивает правильную диффузию соединения в организме и достижение интересующей ткани. В другом варианте осуществления введение осуществляется внутриопухолевой инъекцией.

Соединение следует вводить в количестве, достаточном для облучения опухоли. Такое количество может быть отрегулировано специалистом в данной области.

Лечение может применяться либо отдельно, либо в сочетании (например, поочередно или совместно) с другими видами лечения рака, такими как, например, химиотерапия.

Способ можно использовать для лечения любого рака с избыточной экспрессией LDLR, такого как рак поджелудочной железы, рак надпочечника, рак простаты, рак толстой кишки, рак печени, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак легких или рак желудка. Он может быть использован на любой стадии развития рака у любого млекопитающего, особенно у человека. Как правило, выполняются несколько последовательных схем лечения. Для применения в терапии конъюгаты по изобретению могут быть в форме любых фармацевтически приемлемых солей. Выражение «фармацевтически приемлемые соли» относится, например, к неограничивающему способу, к фармацевтически приемлемым основаниям или солям присоединения кислоты, гидратам, сложным эфирам, сольватам, предшественникам, метаболитам или стереоизомерам. Выражение «фармацевтически приемлемые соли» относится к нетоксичным солям, которые обычно можно получить путем взаимодействия свободного основания с подходящей органической или неорганической кислотой. Эти соли сохраняют биологическую эффективность и свойства свободных оснований. Типичные примеры таких солей включают водорастворимые и водонерастворимые соли, такие как ацетаты, N-метилглюкамин аммония, амсонаты (4,4-диаминостилбен-2,2'-дисульфонаты), бензолсульфонаты, бензонаты, бикарбонаты, бисульфаты, битартраты, бораты, гидробромиды, бромиды, бутираты, камзилаты, карбонаты, гидрохлораты, хлориды, цитраты, клавуланаты, дихлоргидраты, дифосфаты, этилендиаминтетраацетаты, этилендиаминтетраацетаты кальция, эдисилаты, эстолаты, эсилаты, фумараты, глюцептаты, глюконаты, глутаматы, гексафторсульфаты, гексилрезорцинаты, гидрабамины, гидробромиды, гидроксинафтоаты, йодиды, изотионаты, лактаты, лактобионаты, лаураты, малаты, малеаты, манделаты, мезилаты, метилбромиды, метилнитраты, метилсульфаты, мукаты, напсилаты, нитраты, 3-гидрокси-2-нафтоаты, олеаты, оксалаты, пальмитаты, памоаты (1-метилен-бис-2-гидрокси-3-нафтоаты, или эмбоаты), пантотенаты, фосфаты, пикраты, полигалактуронаты, пропионаты, п-

толуолсульфонаты, салицилаты, стеараты, субацетаты, сукцинаты, сульфаты, сульфосалицилаты, сураматы, таннаты, тартраты, теоклаты, тозилаты, триэтиодиды, трифторацетаты и валерианаты.

Также конъюгаты могут быть составлены с любым подходящим фармацевтическим наполнителем, носителем или разбавителем. В этом отношении изобретение также относится к композициям, содержащим соединение, как определено выше, и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель. Фармацевтически приемлемый носитель может быть выбран из носителей, классически используемых в соответствии с каждым способом введения. В соответствии с предусмотренным способом введения соединения могут быть в твердой, полутвердой или жидкой форме. Для твердых композиций, таких как таблетки, пилюли, порошки или гранулы, которые являются свободными или включены в желатиновые капсулы, активное вещество можно комбинировать с: a) разбавителями, например лактозой, декстрозой, сахарозой, маннитом, сорбитом, целлюлозой и/или глицином; b) смазывающими веществами, например кремнеземом, тальком, стеариновой кислотой, ее магниевой или кальциевой солью и/или полиэтиленгликолем; c) связующими веществами, например силикатом магния и алюминия, крахмальной пастой, желатином, трагакантом, метилцеллюлозой, натриевой солью карбоксиметилцеллюлозы и/или поливинилпирролидоном; d) разрыхлителями, например крахмалом, агаром, альгиновой кислотой или ее натриевой солью или шипучими смесями; и/или d) абсорбентами, красителями, ароматизаторами и подсластителями. Наполнителями могут быть, например, маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, тальк, целлюлоза, глюкоза, сахароза, карбонат магния и аналоги фармацевтического качества. Для полутвердых композиций, таких как суппозитории, вспомогательное вещество может, например, представлять собой эмульсию или суспензию на основе масла или полиалкиленгликоля, такого как полипропиленгликоль. Жидкие композиции, в частности инъецируемые или включенные в мягкую капсулу, могут быть приготовлены, например, путем растворения, диспергирования или иной обработки активного вещества в фармацевтически чистом растворителе, таком как, например, вода, физиологический солевой раствор, водная декстроза, глицерин, этанол, масло и их аналоги.

Композиции или конъюгаты по изобретению можно вводить любым подходящим путем и, не ограничивающим образом, парентеральным путем, таким как, например, в форме препаратов, которые можно вводить внутривенно, инфузионно, подкожно или внутримышечным путем; пероральным путем (или *per os*), таким как, например, в форме таблеток с покрытием или без покрытия, желатиновых капсул, порошков, гранул,

суспензий или пероральных растворов (одна такая форма для перорального введения может быть представлять собой форму с немедленным высвобождением, либо с пролонгированным или отсроченным высвобождением); ректальным путем, таким как, например, в форме суппозиториев; местным путем, в частности, трансдермальным путем, таким как, например, в форме пластырей, помад или гелей; интраназальным путем, таким как, например, в форме аэрозоля и распыления; перилингвальным путем; или внутриглазным путем.

Изобретение также относится к способу получения или изготовления конъюгатного соединения, как определено выше, включающему связывание маркера M с пептидом P, предпочтительно с использованием хелатирующего агента C.

Изобретение также относится к способу получения фармацевтической композиции, включающему предоставление конъюгатного соединения, как определено выше, и сочетание указанного соединения с подходящим наполнителем или разбавителем.

Другие аспекты и преимущества настоящего изобретения станут очевидными при рассмотрении приведенных ниже примеров, которые носят только иллюстративный характер и не ограничивают объем настоящей заявки.

Примеры

Пример 1. Экспрессия LDL-рецептора (LDLR) в тканях мыши и человека.

Для оценки мембранной экспрессии LDLR в представляющих интерес клеточных линиях мыши и человека использовали набор ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem, Ла-Хойя, штат Калифорния, США) для приготовления мембранных экстрактов из линий раковых клеток человека и мыши.

Мембранные экстракты определяли количественно с помощью анализа белка BioRad DC (Bio-Rad, Геркулес, штат Калифорния, США), следуя инструкциям производителя. 1 мкг, 10 мкг или 20 мкг белков мембранных клеток разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) на 4-12% полиакриламидных гелях и переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Amersham Biosciences). Мембраны исследовали с использованием козьего антитела против LDLR (R&D Systems, (1/500)), а затем конъюгированного с пероксидазой вторичного анти-козьего антитела из осла (Jackson Immunoresearch). Наконец, белки были обнаружены с использованием хемилюминесценции.

Как показано на фиг. 1A, экспрессия LDLR повышается в клетках надпочечников (NCI-H295R), глиобластомы (U87MG), рака молочной железы (MDA-MB-231) и рака предстательной железы (PC3) человека. CHO95 (модифицированные клетки яичника китайского хомячка, стабильно экспрессирующие hLDLR, слитые с GFP (hLDLR-GFP),

используют в качестве положительного контроля. В раковых клетках поджелудочной железы человека (Capan, BxPC3 и Panc1) уровень LDLR является переменным. В других типах клеток, таких как Hela (рак шейки матки) или клетки рака молочной железы MCF7, уровни экспрессии LDLR являются очень низкими и почти не обнаруживаются. Экспрессия LDLR усиливается в линии клеток поджелудочной железы мыши PK4A (происходящей от мыши, у которой развиваются спонтанные опухоли в поджелудочной железе) по сравнению с нормальной тканью поджелудочной железы.

Пример 2. Синтез флуоресцентных конъюгатов, нацеленных на LDLR: конъюгат A, конъюгат B, конъюгат C и конъюгат D.

В следующих примерах раскрыто получение и применение конъюгатов A, B, C и D. Конъюгаты A, B, C и D содержат, соответственно, пептиды A (SEQ ID NO: 1), B (SEQ ID NO: 13), C (SEQ ID NO: 6) и D (SEQ ID NO: 14), как показано ниже.

Соединение	Композиция
Конъюгат A	Fc-пептид A-A680
Конъюгат B	Fc-пептид B-A680
Конъюгат C	Fc-пептид C-A680
Конъюгат D	Fc-пептид D-A680

Получение слитого белка из конъюгата C и конъюгата D

Пептиды C и D были клонированы в слиянии с Fc-фрагментом IgG1.

Для получения фрагмента Fc, слитого с пептидом C или D, была создана плазмидная конструкция на основе плазмиды pINFUSE hIgG1-Fc2 (InvivoGen), которая использовалась в качестве матрицы. Мегапраймеры, называемые праймером C или праймером D, были синтезированы методом ПЦР с использованием олигонуклеотидов:

- Прямой праймер:

CTTGGCATTATGCACCTCCA (SEQ ID NO: 10)

- Обратный праймер, содержащий последовательность, кодирующую пептид **C**:

CTGGCCAGCTAGCACTCA**GCAACCGCGAAGACGAGGCATACA**AGCACCTTT ACCCGGAGACAGGGAG (SEQ ID NO: 11).

- Обратный праймер, содержащий последовательность, кодирующую пептид **D**:

CTGGCCAGCTAGCACTC**GCAGGGTCTGCCCAGCATTCTGCA**AGCACCTTTA CCCGGAGACAGGGAG (SEQ ID NO: 12).

Продукт реакции ПЦР очищали, расщепляли DpnI (ферментом, который расщепляет метилированную родительскую ДНК) и использовали в качестве мегапраймера во второй реакции ПЦР, проводимой с плазмидой pINFUSE hIgG1-Fc2, используемой в качестве матрицы, с использованием набора сайт-направленного мутагенеза QuickChange II (Agilent). После трансформации компетентных бактерий были получены изолированные колонии, была приготовлена плазмидная ДНК, и конструкция

кДНК была секвенирована на обеих цепях для проверки. Векторы, называемые pConjugate C и pConjugate D, позволяют экспрессировать фрагмент Fc, слитый на C-конце с пептидами C и D после трансфекции клеток млекопитающих. Экспрессионную систему Expi293 (Thermo Fischer) использовали для временной экспрессии конъюгатов слитого белка C и D в культуральных супернатантах. После 72 часов трансфекции супернатанты извлекали и очищали с использованием набора PROSEP A белка антитела Montage A (Millipore) в соответствии с рекомендациями производителя.

Синтез белка конъюгата A и конъюгата B:

Конъюгирование пептидов A и B с Fc-фрагментом IgG1 человека (Merck Millipore) проводили с использованием гетеробифункционального спейсера сульфо-SMCC (Pierce Biotechnology, Рокфорд, штат Иллинойс, США) в два этапа. Во-первых, фрагменту Fc давали реагировать с сульфо-SMCC для получения реактивного белка против тиоловых фрагментов; на второй стадии тиол-функционализированные пептиды A или B были конъюгированы с лизин-связанным белком Fc-SMCC.

Синтез тиол-функционализированных пептидов

Аминокислотные последовательности пептида A и пептида B представляют собой соответственно cMThzRLRGPen (SEQ ID NO: 1) и cRPLGRMC (SEQ ID NO: 13), где «Thz» означает тиазолидин, а «Pen» означает пеницилламин.

N-α-Fmoc-защищенные аминокислоты были выбраны с использованием стандартных ортогональных защитных групп боковой цепи: Fmoc-Cys(Trt)-OH (в конфигурации D или L), Fmoc-Pen(Trt)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Thz-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Leu-OH и Fmoc-Gly-OH. Все они были приобретены у компании Iris Biotech, как и пиперидин, трифторуксусная кислота (TFA), диизопропилэтиламин (DIEA), этандитиол (EDT), триизопропилсилан (TIS), гексафторфосфат бензотриазол-1-ил-окситрипирролинилфосфония (PyBop), гексафторфосфат 1-[бис(диметиламино)метилен]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-β]пиридиния 3-оксида (HATU) и гидрохлорид 2-тритилтио-1-этиламина (Trt-цистеамина).

Диметилформамид (ДМФА), пропионовый ангидрид, AcOH, $K_3[Fe(CN)_6]$, карбонат аммония и дихлорметан (DCM) были приобретены у компании Sigma-Aldrich.

Pr-пептид AG-CH2-CH2-SH и Pr-пептид BG-CH2-CH2-SH были синтезированы методом твердофазного пептидного синтеза (SPPS) с использованием стратегии Fmoc/tBu и смолы Fmoc-Gly-Wang (100-200 меш, 1% DVB, загрузка 0,7 ммоль/г), приобретенной у компании Iris Biotech. Такая смола позволяет синтезировать пептиды, полностью лишенные защиты на боковых цепях и имеющие свободную карбоновую кислоту на C-конце. Остаток Gly вводили в положение концевого C, чтобы обеспечить

функционализацию, избегая при этом рацемизации.

Синтез пептидов проводили на микроволновом синтезаторе Liberty™ (CEM) для последовательностей cMThzRLRGPen и cRPLGRMC.

Для автоматизированного синтеза аминокислоты связывали посредством микроволновой активации кислотной функции аминокислоты n + 1 с использованием aa/DIEA/HATU: 4/4/8 эквивалента (по отношению к смоле) при синтезе в масштабе 0,25 ммоль. Время сочетания было доведено до 10 мин. Двойные сочетания были необходимы для аминокислот, введенных после остатков тиазолидина или пролина. Снятие защиты с группы Fmoc новой аминокислоты, связанной таким образом, осуществляли с использованием 20% пиперидина в ДМФА. С последней аминокислоты, связанной во время удлинения пептида, снимали защиту и N-пропионилировали с использованием пропионового ангидрида (2*5 мин Pr_2O/DCM: 1/1).

Связанные со смолой пептиды затем расщепляли, используя раствор, состоящий из TFA/TIS/H_2O/EDT: 94/2/2/2, по меньшей мере, в течение 2 часов при комнатной температуре (RT). Минимум 15 мл раствора для расщепления использовали на грамм смолы. Сырые пептиды затем осаждали, используя ледяной эфир, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 8 минут и лиофилизировали в H_2O/0,1% TFA. Белые твердые вещества получали и использовали на стадии циклизации без какой-либо дополнительной очистки.

Дисульфидные мостики были получены путем внутримолекулярной циклизации из двух тиоловых функций двух соответственно защищенных Cys или Pen в конфигурации L или D. Неочищенные Pr-cMThzRLRGPen-G-OH и Pr-cRPLGRMC-G-OH растворяли в AcOH 0,5% для получения конечной концентрации 0,5 мг / мл. Карбонат аммония (2N) добавляли к пептидным растворам для достижения приблизительного основного pH 8-9. Затем раствор 0,01 н $K_3[Fe(CN)_6]$ добавляли к реакционным смесям до тех пор, пока не наблюдался яркий и стойкий желтый цвет. Контроль реакций проводили посредством аналитической ОФ-ВЭЖХ. Обычно реакции протекали количественно менее чем за 30 мин. Реакционные смеси фильтровали на мембране 0,45 мкм и очищали препаративной ОФ-ВЭЖХ. Фракции с чистотой выше 95% собирали и лиофилизировали с получением чистых белых порошков (конечная чистота более 95%). Гомогенность и идентичность чистых синтетических пептидов оценивали аналитической ОФ-ВЭЖХ. Пептиды были соответствующим образом проверены на идентичность с помощью масс-спектрометрии ИЭР на приборе LCQ Fleet (ThermoFisher), работающем в положительном режиме.

Тиоловую функционализацию Pr-пептида BG-OH и Pr-пептида AG-OH проводили на их С-концах с использованием цистеамина посредством: i) активации первого остатка

Gly с помощью PyBop/DIEA в ДМФА и реакции с 2-тритилтио-1- гидрохлоридом этиламина (Trt-цистеамин) и ii) удаления тритильных защитных групп цистеамина в кислой среде (DCM/TIS/TFA: 3/1/1).

Химическая конъюгация Pr-пептида A-G-CH_2-CH_2-SH и Pr-пептида B-G-CH_2-CH_2-SH с Fc-фрагментом

На первом этапе пептиды A и B функционализировали спейсером сульфо-SMCC: пептид A-SMCC и пептид B-SMCC вводили в реакцию с первичными аминами фрагмента Fc человека (AG 714-Millipore) с использованием молярного избытка 25 пептидов на Fc. Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре (RT) в течение 1 часа в буфере PBS. Для удаления избытка пептидов смесь затем очищали на колонках для обессоливания декстраном Pierce™ (Pierce). Концентрации конъюгатов Fc-пептид A и Fc-пептид B определяли с использованием анализа ELISA против Fc.

Химический синтез конъюгатов A, B, C и D

Для конъюгирования флуорофора Alexa680TM (возбуждение A680: 679 нм; эмиссия: 702 нм) с Fc-пептидом A, Fc-пептидом B, Fc-пептидом C и Fc-пептидом D использовали набор для быстрой маркировки антител SAIVI™ (S30045-ThermoFicher). Этот набор предназначен для маркировки антител с оптимальной степенью мечения (DOL, отношение красителя к белку) для визуализации *in vivo* (DOL, около 2). DOL каждого конъюгата (см. таблицу I) можно определить с помощью абсорбционной спектроскопии с использованием закона Ламберта-Бера: поглощение (A) = коэффициент экстинкции (ε) × молярная концентрация × длина пути (d). Регистрировали УФ-видимый спектр раствора конъюгата. Определение оптической плотности (Amax) по максимуму поглощения (λabs) красителя и оптической плотности (A280) при 280 нм (максимум поглощения белков) дает доступ к концентрации связанного красителя, определяемой как c (краситель) = Amax/εmax. × d, где εmax представляет собой коэффициент экстинкции красителя в максимуме поглощения и концентрации белка таким же образом, как и при его поглощении при 280 нм: c (белок) = Aprot/εprot × d, где εprot представляет собой коэффициент экстинкции белка при 280 нм. DOL затем вычисляли следующим образом: DOL = [Amax/εmax]/[Aprot/εprot].

Таблица I. Значения DOL конъюгатов

Наименование конъюгата	DOL
Конъюгат A	1,3
Конъюгат B	1,5
Конъюгат C	1,3
Конъюгат D	1,8

Концентрации конъюгатов A, B, C и D определяли с использованием анализа ELISA против Fc.

Пример 3. Определение с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) сродства (K_D)конъюгатов A, B, C и D к LDLR. Связывающие/эндоцитозные свойства конъюгатов с h/m LDLR, стабильно экспрессированными клетками CHO и линиями раковых клеток.

Сродство (K_D) конъюгатов к LDLR

Рекомбинантный человеческий LDLR (His-меченый) был приобретен у компании Sino Biological (Пекин, Китай). Взаимодействие конъюгатов с LDLR исследовали при 25°C с использованием Biacore T200 (GE Healthcare) и 50 мМ HEPES-NaOH pH 7,4, 150 мМ NaCl, 0,005% Tween-20, 50 мкМ EDTA в качестве рабочего буфера. hLDLR иммобилизовали на сенсорном чипе NiHC (Xantec, Дюссельдорф, Германия) при плотности 35-60 фмоль/мм^2. Связывание конъюгатов с проточными клетками, покрытыми LDLR, корректировали с учетом неспецифического связывания с проточными клетками без покрытия. Кинетический метод с одним циклом был использован для измерения сродства лигандов с LDLR. Лиганды разводили в рабочем буфере и вводили последовательно 2 минуты при 30 мкл/мин, используя увеличивающиеся концентрации. Пробные инъекции рабочего буфера выполняли в тех же условиях перед инъекцией лиганда. Сенсограммы с двойным вычитанием были глобально снабжены моделью связывания Ленгмюра 1:1 из Biacore T200 Evaluation версии 2.0. Значения K_D представлены в следующей таблице II:

Таблица II. Сродство конъюгатов A, B, C и D к LDLR человека

Наименование/код конъюгата	kon ($M^{-1}c^{-1}$)	koff (c^{-1})	K_D (pM)
Конъюгат A	1,20E+06	1,38E-04	115
Конъюгат B	Отсутствие связывания		
Конъюгат C	2,89E+05	2,44E-04	835
Конъюгат D	Отсутствие связывания		

Связывание/эндоцитоз флуоресцентных конъюгатов клетками, экспрессирующими LDLR

Для оценки способности конъюгатов с аффинностью к h/mLDLR-GFP (конъюгаты A и C) и контрольных конъюгатов (конъюгаты B и D) подвергаться эндоцитозу с помощью LDLR, иммуноцитохимические эксперименты, включающие инкубацию всех конъюгатов на живых hLDLR-GFP клетках выполняли в течение 1 часа при 37°C с последующим анализом посредством конфокальной микроскопии.

В этих экспериментах, как представлено на фиг. 2, сигнал LDLR-GFP визуализируется в колонке 2, сигнал конъюгата либо непосредственно визуализируется в колонке 4 с использованием флуоресценции A680, либо в колонке 3 с использованием вторичного антитела, конъюгированного с hFc-A594. Ядра клеток окрашивали Hoechst в синий цвет, и его сигнал можно визуализировать в столбце 1. Совместную маркировку

LDLR-GFP и конъюгатов можно визуализировать как сигнал выделения в колонке 5 на изображении слияния. Полученные результаты показывают, что конъюгаты A и C связываются и подвергаются эндоцитозу клетками CHO-hLDLR-GFP в отличие от контрольных конъюгатов B и D.

Пример 4. Количественная оценка методом ELISA распределения конъюгатов, нацеленных на LDLR, внутривенно инъецированных наивным или несущим рак мышам

Клетки аденокарциномы поджелудочной железы мыши PK4A были получены от S. Vasseur (Inserm U1068, Cellular Stress) и описаны ранее (Guillaumond F et al. 2013 Proc Natl Acad Sci USA 110 (10): 3919-3924). Клетки культивировали в модифицированной среде Дульбекко-Игла (DMEM; Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния, США), дополненной пенициллином (100 ед/мл), стрептомицином (100 мкг/мл), фетальной бычьей сывороткой (10% золотая сыворотка, InVitrogen) и инкубировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO_2. Клетки использовали для индукции опухоли. Ксенотрансплантаты опухоли PK4A индуцировали у 4-недельного самца голой мыши Hsd: Athymic Nude-Foxn1nu, полученного от Envigo (Harlan, Индианаполис, штат Индиана, США) путем подкожной инъекции между плечами 1×10^6 клеток, суспендированных в 150 мкл полной среды. Размер опухоли оценивали визуально через день, и животных использовали для экспериментов по визуализации *in vivo*. Как только объем подкожной опухоли PK4A достиг приблизительно 700-1500 $мм^3$ (через 10-14 дней после имплантации), мышам с опухолями вводили в хвостовую вену 5 нмоль конъюгатов. Через 2 часа для конъюгатов A и B и 4 часа для конъюгатов C и D цельную кровь собирали в гепаринизированные пробирки (Sigma Aldrich) и выделяли плазму через 15 мин центрифугирования при 5000 g. Затем мышей перфузировали PBS 1X со скоростью 2 мл/мин в течение 10 мин. Органы экстрагировали, взвешивали и гомогенизировали в PBS/0,1% Triton (Sigma Aldrich) в PBS, содержащем коктейль ингибитора протеазы (Sigma Aldrich). Гомогенаты органов замораживали при -80°C в течение 12 часов, затем обрабатывали ультразвуком 3 × 10 с, а осветление лизатов тканей проводили центрифугированием в течение 15 минут при 20000 g. Концентрации Fc в изолированных супернатантах измеряли с помощью ELISA против Fc. Результаты на фиг. 3 показывают 40-кратное накопление конъюгата A и 30-кратное накопление конъюгата C в опухоли поджелудочной железы по сравнению с поджелудочной железой. Накопление в почках показано в качестве контроля.

Пример 5. Биораспределение конъюгата C и его скремблированного аналога конъюгата D в опухоли поджелудочной железы и здоровой поджелудочной железе

Мышам, несущим опухоль, внутривенно вводили 5 нмоль конъюгата C вместе с конъюгатом D в качестве контроля (n = 5). Флуоресцентное изображение всего тела

контролировали через 15, 30, 60 и 120 мин после внутривенной инъекции. Ткани поджелудочной железы, печени и опухоли собирали в конце эксперимента (через 4 часа после внутривенного введения молекул) и измеряли флуоресценцию *ex-vivo*. На фиг. 4 показано, что конъюгат C значительно накапливается в опухоли поджелудочной железы по сравнению с скремблированным конъюгатом D. Кроме того, это накопление было специфичным для опухоли поджелудочной железы, поскольку в здоровой ткани поджелудочной железы накопление не наблюдалось.

Пример 6. Синтез NODAGA-SEQ ID NO: 1 NH_2, DOTA-SEQ ID NO: 1-NH_2, NODAGA-βAla-PEG12-SEQ ID NO: 1-NH_2, DOTA-βAla-PEG12-SEQ ID NO: 1- NH_2 и их соответствующего контроля скремблирования NODAGA-βAla-PEG12- SEQ ID NO: 13-NH_2 и DOTA-βAla-PEG12-SEQ ID NO: 14-NH_2

В следующих примерах ^{68}Ga-CH44 используется в качестве сокращения для ^{68}Ga-NODAGA-βAla-PEG12-SEQ ID NO: 1-NH_2, ^{68}Ga-FG770 используется в качестве сокращения для ^{68}Ga-DOTA-βAla-PEG12-SEQ ID NO, ^{68}Ga-CH40 используется в качестве сокращения для ^{68}Ga-NODAGA-βAla-PEG12-SEQ ID NO: 13-NH_2, и ^{68}Ga-FG769 используется в качестве сокращения для ^{68}Ga-DOTA-βAla-PEG12-SEQ ID NO: 13-NH_2.

Сокращение	Соединение
^{68}Ga-CH44	^{68}Ga-NODAGA-βAla-PEG12-SEQ ID NO: 1-NH_2
^{68}Ga-CH40	^{68}Ga-NODAGA-βAla-PEG12-SEQ ID NO: 13-NH_2
^{68}Ga-FG770	^{68}Ga-DOTA-βAla-PEG12-SEQ ID NO: 1-NH_2
^{8}Ga-FG769	^{68}Ga-DOTA-βAla-PEG12-SEQ ID NO: 13-NH_2

Два типа структуры «хелатирующая клетка» были конъюгированы с LDLR-нацеленными пептидными векторами:

- NODAGA (1,4,7-триазациклононан-1-глутаровая кислота-4,7-диуксусная кислота) позволяет синтезировать меченые радиоактивным изотопом конъюгаты для визуализации;

- DOTA (тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота) был введен для приготовления меченых радиоактивным изотопом конъюгатов, обладающих потенциалом для лучевой терапии.

Макроциклическая NOTA (1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триуксусная кислота) и NODAGA представляют собой наиболее подходящие лиганды для хелатирования галлия-68, который является широко используемым радиоактивным индикатором. Среди этих лигандов была выбрана NODAGA, поскольку эта «хелатирующая клетка» содержит дополнительный связывающий фрагмент по сравнению с NOTA. Это гарантирует, что все карбоксильные группы доступны для насыщения гексадентатной координации.

Для лучевой терапии в клинических условиях используют индий-111, лютеций-177 или иттрий-90. Такие радиоактивные металлы хорошо вписываются в макроциклические хелаторы DOTA, с которыми они образуют термодинамически и кинетически стабильные

комплексы. Действительно, DOTA обеспечивает восемь донорных атомов и соответствующий размер полости для образования более стабильных комплексов с этими радионуклидами.

Производные как NODAGA, так и DOTA были подготовлены для разработки визуализирующих агентов и лучевой терапии, опосредованной рецепторами, способной преимущественно нацеливаться на рак, экспрессирующий LDLR.

Различные конструкции были разработаны и подготовлены для оценки положения и расстояния макроциклического хелатора, конъюгированного с пептидными векторами: хелатирующий агент был конъюгирован либо с C-концом, N-концом, либо с боковой аминогруппой лизина дополнительно введена последовательность пептидного вектора. Все производные всегда связаны с целевым рецептором LDLR, что оценивается с помощью анализа SPR на очищенном LDLR. Таким образом, мы выбрали конструкцию, несущую хелатирующий агент на N-конце, поскольку этот путь синтеза легче организовать.

На фиг. 5 представлена схема реакции синтеза конъюгатов клетка-линкер-пептид-NH_2. На представленной схеме показан пример синтеза NODAGA-βAla-PEG12-SEQ ID NO: 1-NH_2.

Реагенты и условия реакции синтеза являются следующими со ссылкой на фиг. 5:

- этап a: AA (4 эквивалента (экв.)), HATU (4 эквивалента), DIEA (8 экв.), DMF, микроволновая активация;

- этап b: Fmoc-PEG12-OH (1,5 экв.), DIC (4 экв.), HOBt (2 экв.), DMF, комнатная температура (RT), 24 ч;

- этап c: Fmoc- (β)Ala-OH (3 экв.), COMU (3 экв.), DIEA (8 экв.), DMF, RT, 3 ч;

- этап d: ДМФА/пиперидин (20%) 15 минут, TFA/TIS/H_2O/EDT (94/2/2/2), RT, 2 ч;

- этап e: AcOH (0,5%), $(NH_4)_2CO_3$, $K_3Fe(CN)_6$, pH = 7-8, [пептид] = 1 мг/мл;

- этап f: NODAGA-NHS (2 экв.), DIEA (10 экв.), DMF, RT, 30 мин.

Методы анализа и очистки:

- Мониторинг хода реакции и чистоты проводили на системе Thermo Fisher UltiMate® 3000, оснащенной C18 KinetexTM (5 мкм, 150 мм x 4,6 мм). Обнаружение проводили при 214 нм. Система элюирования состояла из H_2O/0,1% TFA (раствор A) и MeCN/0,1% TFA (раствор B). Скорость потока составляла 2 мл/мин с градиентом 0-100% раствора B за 4 мин.

- Неочищенные продукты очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ на системе Thermo Fisher UltiMate® 3000, оборудованной C18 LunaTM (5 мкм, 100 мм x 21,2 мм). Обнаружение проводили при 214 нм. Система элюирования состояла из H_2O/0,1% TFA

(раствор A) и MeCN/0,1% TFA (раствор B). Скорость потока составляла 20 мл/мин.

Синтез H-SEQ ID NO: 1-NH_2, H-βAla-PEG12-SEQ ID NO: 1-NH_2 и H-βAla-PEG12-SEQ ID NO: 13-NH_2:

N-α-Fmoc-защищенные аминокислоты были выбраны с использованием стандартных ортогональных защитных групп боковой цепи: Fmoc-Cys(Trt)-OH (в конфигурации D или L), Fmoc-Pen(Trt)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Thz-OH, Fmoc-Arg (Pbf) -OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-βALa-OH и Fmoc-Gly-OH. Все они были приобретены у компании Iris Biotech, как и пиперидин, трифторуксусная кислота (TFA), диизопропилэтиламин (DIEA), этандитиол (EDT), триизопропилсилан (TIS), гексафторфосфат 1-циан-2-этокси-2-оксоэтилиденаминоокси)диметиламино-морфолинокарбения (COMU), гексафторфосфат 1-[бис(диметиламино)метилен]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-β]пиридиний-3-оксида (HATU), N,N'-диизопропилкарбодиимид (DIC) и 1-гидроксибензотриазол.

Диметилформамид (DMF) и дихлорметан (DCM) были приобретены у компании Sigma-Aldrich.

Fmoc-21-амино 4,7,10,13,16,19-гексаоксахеникозановая кислота (Fmoc-PEG12-OH) была приобретена у компании PolyPeptide Laboratories.

Конъюгаты H-SEQ ID NO: 1-NH_2, H-βAla-PEG12-SEQ ID NO: 1-NH_2 и H-βAla-PEG12-SEQ ID NO: 13-NH_2 были синтезированы методом твердофазного пептидного синтеза (SPPS) с использованием метода Fmoc/tBu и амидной смолы Fmoc-Rink (100-200 меш, 1% DVB, загрузка 0,7 ммоль/г), приобретенной у компании Iris Biotech. Такая смола позволяет синтезировать пептиды, полностью лишенные защиты на боковых цепях и имеющие C-концевой амид.

Синтез пептидов проводили на микроволновом синтезаторе Liberty™ (CEM) для последовательностей cMThzRLRGPen (SEQ ID NO: 1) и cRPLGRMC (SEQ ID NO: 13), в то время как линкеры Fmoc-βAla-OH и Fmoc-PEG12-OH были связаны вручную при необходимости.

Для автоматизированного синтеза аминокислоты связывали посредством микроволновой активации кислотной функции аминокислоты n + 1 с использованием aa/DIEA/HATU: 4/4/8 эквивалента (по отношению к смоле) в синтезе в масштабе 0,25 ммоль. Время сочетания было доведено до 10 мин. Двойные сочетания были необходимы для аминокислот, введенных после остатков тиазолидина или пролина. Снятие защиты с группы Fmoc новой аминокислоты, связанной таким образом, осуществляли с использованием раствора 20% пиперидина в DMF. С последней аминокислоты, связанной во время удлинения пептида, снимали защиту, чтобы обеспечить дальнейшее связывание

на N-конце. Для последовательностей с линкером, введенным между клеткой и пептидным вектором, Fmoc-PEG12-OH затем вводили вручную, используя aa/DIC/HOBt: 1,5/4/2 эквивалента (по отношению к смоле). Реакцию проводили в течение ночи при комнатной температуре. Тест TNBS позволил контролировать эффективность сцепления. После снятия защиты с Fmoc раствором пиперидин/DMF (20%, 3*5 мин) Fmoc-βALa-OH окончательно конъюгировали со свободным N-концом, используя aa/DIEA/COMU: 3/8/3 эквивалента в течение 3 часов при комнатной температуре. Тест TNBS позволил контролировать эффективность связывания, и Fmoc удаляли раствором 20% пиперидина в DMF (3*5 мин).

Связанные со смолой пептиды расщепляли, используя раствор, состоящий из TFA/TIS/H_2O/EDT: 94/2/2/2, по меньшей мере, в течение 2 часов при комнатной температуре (RT). Минимум 15 мл раствора для расщепления использовали на грамм смолы. Сырые пептиды затем осаждали, используя ледяной эфир, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 8 минут и лиофилизировали в H_2O/0,1% TFA. Белые твердые вещества получали и использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки.

Циклизация конъюгатов H-SEQ ID NO: 1-NH_2, H-βAla-PEG12-SEQ ID NO: 1-NH_2 и H-βAla-PEG12-SEQ ID NO: 13-NH_2:

Дисульфидные мостики были получены путем внутримолекулярной циклизации из двух тиоловых функций двух соответственно защищенных Cys или Pen в конфигурации L или D. AcOH, $K_3[Fe(CN)_6]$ и карбонат аммония были приобретены у компании Sigma-Aldrich. Неочищенные когъюгаты H-SEQ ID NO: 1-NH_2, H-βAla-PEG12-SEQ ID NO: 1-NH_2 и H-βAla-PEG12-SEQ ID NO: 13-NH_2 растворяли в AcOH 0,5% с получением конечной концентрации 0,5 мг/мл. Карбонат аммония (2 н) добавляли к пептидным растворам для достижения приблизительного основного pH 8-9. Затем $K_3[Fe(CN)_6]$ (0,01 н) добавляли к реакционным смесям до тех пор, пока не наблюдался яркий и стойкий желтый цвет. Контроль реакций проводили методами аналитической ОФ-ВЭЖХ. Обычно реакции протекали количественно менее чем за 30 мин. Реакционные смеси фильтровали на мембране 0,45 мкм и очищали препаративной ОФ-ВЭЖХ. Фракции с чистотой выше 95% собирали и лиофилизировали с получением чистых белых порошков (конечная чистота более 95%). Гомогенность и идентичность чистых синтетических пептидов оценивали аналитической ОФ-ВЭЖХ. Пептиды были удовлетворительно проверены на идентичность с помощью масс-спектрометрии ИЭР на приборе LCQ Fleet (ThermoFisher), работающем в положительном режиме.

Конъюгация NODAGA и DOTA к H-SEQ ID NO: 1-NH_2, H-βAla-PEG12-SEQ ID NO: 1-NH_2 и H-βAla-PEG12-SEQ ID NO: 13-NH_2:

Хелаторы были конъюгированы с пептидами с использованием активированных сложных эфиров моно-N-гидроксисукцинимида NODAGA (NODAGA-NHS) и моно-N-гидроксисукцинимида DOTA (DOTA-NHS).

NODAGA-NHS и DOTA-NHS были получены от компании Chematech (Дижон, Франция).

К раствору пептида в ДМФА (1,2 мМ) добавляли хелатирующий агент (4 экв.) и DIEA (10 экв.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Мониторинг реакции с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ показал, что реакция протекала количественно. Реакционные смеси фильтровали на мембране 0,45 мкм и очищали препаративной ОФ-ВЭЖХ. Фракции с чистотой выше 95% собирали и лиофилизировали с получением чистых белых порошков (конечная чистота более 95%). Гомогенность и идентичность чистых синтетических пептидов оценивали аналитической ОФ-ВЭЖХ. Пептиды были удовлетворительно проверены на идентичность с помощью масс-спектрометрии ИЭР на приборе LCQ Fleet (ThermoFisher), работающем в положительном режиме.

Пример 7. Определение посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR) сродства MG04/VH-DO35, CH44, FG770, CH40 и FG769 (K_D) к LDLR.

Сродство (K_D) конъюгатов к LDLR

Рекомбинантный человеческий LDLR (His-меченый) был приобретен у компании Sino Biological (Пекин, Китай). Взаимодействие конъюгатов с LDLR исследовали при 25°C с использованием Biacore T200 (GE Healthcare) и 50 мМ HEPES-NaOH pH 7,4, 150 мМ NaCl, 0,005% Tween-20, 50 мкМ EDTA в качестве рабочего буфера. hLDLR иммобилизовали на сенсорном чипе NiHC (Xantec, Дюссельдорф, Германия) при плотности 35-60 фмоль/$мм^2$. Связывание конъюгатов с проточными клетками, покрытыми LDLR, корректировали с учетом неспецифического связывания с проточными клетками без покрытия. Кинетический метод с одним циклом был использован для измерения сродства лигандов с LDLR. Лиганды разводили в рабочем буфере и вводили последовательно 2 минуты при 30 мкл/мин, используя увеличивающиеся концентрации. Пробные инъекции рабочего буфера выполняли в тех же условиях перед инъекцией лиганда. Сенсограммы с двойным вычитанием были глобально снабжены моделью связывания Ленгмюра 1: 1 из Biacore T200 Evaluation версии 2.0. Значения K_D представлены в следующей таблице II:

Таблица II. Сродство к LDLR конъюгатов CH40, FG769, CH44, FG770 и MG04.

Наименование/код конъюгата	kon ($M^{-1}c^{-1}$)	koff (c^{-1})	K_D (нМ)
CH44	2,84E+06	6,73E-02	23.7
CH40	Отсутствие связывания		
FG770	3,72E+05	4,01E-02	108
FG769	Отсутствие связывания		
MG04 или VH-DO35	3,72E+06	5,59E-02	16.6

Пример 8. ПЭТ-визуализация ^{68}Ga-CH44 и его скремблированного аналога ^{68}Ga-CH40 в подкожной мышиной модели опухоли надпочечника.

Целью этого примера было использование ПЭТ-сканирования для оценки биораспределения конъюгата, нацеленного на LDLR (^{68}Ga-CH44) и его скремблированный аналог (^{68}Ga-CH40) после внутривенного введения мышам с имплантированным раком надпочечника (модель ксенотрансплантата). ^{18}F-FDG использовали в качестве контроля.

Материалы

Радиоактивная метка

CH44 и CH40 были мечены радиоактивным изотопом с использованием хлорида ^{68}Ga. Галлий был получен в форме ^{68}Ga3+ с использованием промышленного генератора ^{68}Ge/^{68}Ga на основе TiO_2 (Обнинск). Реакцию радиоактивной метки проводили путем взаимодействия 20 мкг NODAGA-CH44 и 40 мкг NODAGA-CH40 с 74-148 МБк (2-4 мКи) ^{68}Ga в 200 мкл аммоний-ацетатного буфера (4M, pH 6) при 25°C в течение 15 минут.

Удельная активность, полученная для ^{68}Ga-CH44 и ^{68}Ga-CH40, составила 12,5 Бк/ммоль и 5,5 Бк/ммоль соответственно.

Имплантация опухоли

Исследования на животных выполняли в соответствии с протоколами, утвержденными Экс-Марсельским этическим комитетом (комитет 14). Четырехнедельных самцов голой мыши BALB/c получали от компании Charles River Inc. Мышам имплантировали подкожно в верхние боковые стороны живота клетки NCI-H295R (7×10^6) в 150 мкл полной среды, содержащей 50% Matrigel (Corning). Мышей использовали для экспериментов по визуализации, когда опухоли достигали объема, составляющего 700-1500 $мм^3$.

Путь введения, доза и схема эксперимента

Животные получали испытуемое вещество внутривенно одним болюсом в дозе 10±4 МБк ^{68}Ga-CH44 или ^{68}Ga-CH40.

Шести мышам были имплантированы клетки рака надпочечников NCI-H295R. На 14 день после имплантации животным вводили внутривенно с интервалом 24 часа ^{18}F-FDG, ^{68}Ga-CH44 и ^{68}Ga-CH40 соответственно. На 32 день после имплантации животным вводили внутривенно ^{68}Ga-CH44, а спустя 24 часа - ^{68}Ga-CH40. После каждого введения

биораспределение в ксенотрансплантате рака надпочечника и других тканях оценивали с использованием ПЭТ-визуализации.

ПЭТ-сканирование

Группам (n = 5-7) голых мышей внутривенно вводили 10±4 МБк ^{68}Ga CH44, и результаты сканирования PET/CT получали через 1 ч после инъекции (п. и.). Исследования ПЭТ и ПЭТ/КТ проводили на сканере моделей грызунов microPET/microCT (nanoPET/CT®, Mediso). Анестезию индуцировали 5% изофлураном и поддерживали на уровне 1,5%. Для улучшения качества изображения было получено 20 миллионов событий совпадения на мышь для каждого статического сканирования ПЭТ-излучения (энергетическое окно, 400-600 кэВ; время: 20 минут для одного поля зрения). Для ПЭТ/КТ с двойной модальностью были получены КТ-изображения (35 кВп, время экспозиции 350 нс и средний зум), и анатомическая регистрация, а также ослабление коррекции были применены к соответствующим ПЭТ-сканам. Через шесть часов после первой инъекции той же группе голых мышей вводили 10±4 МБк ^{68}Ga CH40, и через 1 час после инъекции (п. и.) получали сканы ПЭТ/КТ, эта серия данных составляла контрольную группу.

Результаты

ПЭТ-визуализация

Получение изображений было выполнено на 14 день для всех трех соединений и на 32 день для ^{68}Ga-CH44, ^{68}Ga-CH40. На 14 день изображения животных, которым инъецировали 18F-FDG, не показали значительного накопления в месте опухоли (фиг. 6A).

В отличие от этого, на 14 день (фиг. 6B и C) и 32 (фиг. 7A и B) изображения большинства животных показали значительное накопление ^{68}Ga-CH44 по сравнению с ^{68}Ga-CH40.

Вывод

Эксперименты показали у большинства животных четкую и селективную визуализацию и маркировку рака надпочечника с ^{68}Ga-CH44 на 14 и 32 день.

Пример 9. ПЭТ-визуализация ^{68}Ga-FG770 и его скремблированного аналога ^{68}Ga-FG769 в подкожной мышиной модели опухоли надпочечника.

Целью этого примера было использование ПЭТ-сканирования для оценки биораспределения конъюгата, нацеленного на LDLR (^{68}Ga-FG770) и его скремблированный аналог (^{68}Ga-FG769) после внутривенного введения мышам симплантированным раком надпочечника (модель ксенотрансплантата). Клетка, использованная в этом исследовании, представляла собой DOTA вместо NODAGA.

Материалы

Радиоактивная метка

FG770 и FG769 были мечены радиоактивным изотопом с использованием хлорида ^{68}Ga. Галлий был получен в форме $^{68}Ga^{3+}$ с использованием промышленного генератора ^{68}Ge/^{68}Ga на основе TiO_2 (Обнинск). Реакцию радиоактивной метки проводили путем взаимодействия 20 мкг DOTA-FG770 и 20 мкг DOTA-FG769 с 74-148 МБк (2-4 мКи) ^{68}Ga в 100 мкл аммоний-ацетатного буфера (2М, pH 4,5) при 95°C в течение 15 минут.

Удельные активности, полученные для ^{68}Ga-FG770 и ^{68}Ga-FG769, составили 6,45 Бк/ммоль и 6,16 Бк/ммоль, соответственно.

Имплантация опухоли

Исследования на животных выполняли в соответствии с протоколами, утвержденными Экс-Марсельским этическим комитетом (комитет 14). Четырехнедельных самцов голой мыши BALB/c получали от компании Charles River Inc. Мышам имплантировали подкожно в верхние боковые стороны живота клетки NCI-H295R (7×10^6) в 150 мкл полной среды, содержащей 50% Matrigel (Corning). Мышей использовали для экспериментов по визуализации, когда опухоли достигали объема, составляющего 700-1500 мм^3.

Путь введения, доза и схема эксперимента

Животные получали испытуемое вещество внутривенным одиночным болюсом в дозе 10±4 МБк ^{68}Ga-FG770 или ^{68}Ga-FG769.

Шести мышам были имплантированы клетки рака надпочечников NCI-H295R. На 37 день после имплантации животным вводили внутривенно с интервалом в 24 часа ^{68}Ga-FG770 и ^{68}Ga-FG769, соответственно. После введения биораспределение в ксенотрансплантате рака надпочечника и других тканях оценивали с использованием ПЭТ-визуализации.

ПЭТ-сканирование

Группам (n = 3) голых мышей внутривенно вводили 10±4 МБк ^{68}Ga-FG770, и результаты сканирования ПЭТ/КТ были получены через 1 ч после инъекции (п. и.). Исследования ПЭТ и ПЭТ/КТ проводили на сканере моделей грызунов microPET/microCT (nanoPET/CT®, Mediso). Анестезию индуцировали 5% изофлураном и поддерживали на уровне 1,5%. Для улучшения качества изображения было получено 20 миллионов событий совпадения на мышь для каждого статического сканирования ПЭТ-излучения (энергетическое окно, 400-600 кэВ; время: 20 минут для одного поля зрения). Для ПЭТ/КТ с двойной модальностью были получены КТ-изображения (35 кВп, время экспозиции 350 нс и средний зум), и анатомическая регистрация, а также коррекция затухания были

применены к соответствующим ПЭТ-сканированиям.

Через 24 часа после первой инъекции той же группе голых мышей внутривенно вводили 10±4 МБк ^{68}Ga-FG769, и через 1 ч и 4 ч после инъекции получали ПЭТ/КТ (количественная оценка интересующей области (ROI)). Анализ изображений ПЭТ проводили на ПЭТ-изображениях с поправкой на затухание и коррекцию с использованием Interviewfusion.

Результаты

ПЭТ-визуализация

Получение изображения было выполнено на 37 день для обоих соединений ^{68}Ga-FG770 и ^{68}Ga-FG769. Изображения у большинства животных показали значительное накопление ^{68}Ga-FG770 по сравнению с ^{68}Ga-FG769 (фиг. 8A и 8B, соответственно).

Вывод

Эксперименты показали у большинства животных четкую и селективную визуализацию и маркировку рака надпочечника с помощью ^{68}Ga-FG770 на 37 день.

Пример 10. ПЭТ-визуализация ^{68}Ga-CH44 и его скремблированного аналога ^{68}Ga-CH40 на подкожной мышиной модели рака поджелудочной железы.

Целью этого примера было использование ПЭТ-сканирования для оценки биораспределения конъюгата, нацеленного на LDLR (^{68}Ga-CH44) и его скремблированный аналог (^{68}Ga-CH40) после внутривенного введения мышам с имплантированным раком поджелудочной железы (модель ксенотрансплантата). ^{18}F-FDG использовали в качестве контроля.

Материалы

Радиоактивная метка

CH44 и CH40 были мечены радиоактивным изотопом с использованием хлорида ^{68}Ga. Галлий был получен в форме ^{68}Ga3+ с использованием промышленного генератора ^{68}Ge/^{68}Ga на основе TiO_2 (Обнинск). Реакцию радиоактивной метки проводили путем взаимодействия 20 мкг CH44 и 40 мкг CH40 с 74-148 МБк (2-4 мКи) ^{68}Ga в 200 мкл аммоний-ацетатного буфера (4M, pH 6) при 25°C в течение 15 минут.

Удельная активность, полученная для ^{68}Ga-CH44 и ^{68}Ga-CH40, составила 12,5 Бк/ммоль и 5,5 Бк/ммоль соответственно.

Имплантация опухоли

Исследования на животных выполняли в соответствии с протоколами, утвержденными Экс-Марсельским этическим комитетом (комитет 14). Четырехнедельных самцов голой мыши BALB/c получали от компании Charles River Inc. Мышам подкожно имплантировали между плечами клетки Pk4a (1×10^6) в 150 мкл полной среды. Мышей

использовали для экспериментов по визуализации, когда опухоли достигали объема, составляющего 700-1500 мм^3.

Путь введения, доза и схема эксперимента

Животные получали испытуемое вещество внутривенным однократным болюсом в дозе 10±4 МБк ^{68}Ga-CH44 и ^{68}Ga-CH40.

Мышам (n = 5-6) имплантировали клетки рака поджелудочной железы Pk4a. На четвертый день после имплантации животным вводили внутривенно с интервалом 24 часа ^{18}F-FDG, ^{68}Ga-CH44 и ^{68}Ga-CH40, соответственно. На 12 день после имплантации животным вводили внутривенно ^{68}Ga-CH44, а спустя 24 часа - ^{68}Ga-CH40.

После каждого введения биораспределение в ксенотрансплантате рака поджелудочной железы и других тканях оценивали с использованием ПЭТ-визуализации.

ПЭТ-сканирование

Группам (n = 5-7) голых мышей внутривенно вводили 10±4 МБк ^{68}Ga CH44, и результаты сканирования ПЭТ/КТ получали через 1 час после инъекции (п. и.). Исследования ПЭТ и ПЭТ/КТ проводили на сканере моделей грызунов microPET / microCT (nanoPET/CT®, Mediso). Анестезию индуцировалась 5% изофлураном и поддерживали на уровне 1,5%. Для улучшения качества изображения было получено 20 миллионов событий совпадения на мышь для каждого статического сканирования ПЭТ-излучения (энергетическое окно, 400-600 кэВ; время: 20 минут для одного поля зрения). Для ПЭТ/КТ с двойной модальностью были получены КТ-изображения (35 кВп, время экспозиции 350 нс и средний зум), и анатомическая регистрация, а также ослабление коррекции были применены к соответствующим ПЭТ-сканам. Через шесть часов после первой инъекции той же группе голых мышей было введено 10±4 МБк ^{68}Ga-CH40, и через 1 час после инъекции было получено сканирование ПЭТ/КТ, т.е. эта серия данных составила контрольную группу.

Результаты

ПЭТ-визуализация

Получение изображения было выполнено в 4 день для ^{18}F-FDG, ^{68}Ga-CH44 и ^{68}Ga-CH40 и 12 дня для ^{68}Ga-CH44 и ^{68}Ga-CH40. Не было значительного накопления различных соединений на 4 день из-за небольшого размера опухоли (фиг. 9A-9C, соответственно). Однако изображения, полученные с помощью изображений, показали, что у большинства животных наблюдается значительное накопление ^{68}Ga-CH44 по сравнению с ^{68}Ga-CH40 на 12 день (фиг. 10A-10B, соответственно).

Вывод

Эксперименты показали четкую и селективную визуализацию и маркировку рака

поджелудочной железы с ^{68}Ga-CH44 на 12 день.

Пример 11. ПЭТ-визуализация ^{68}Ga-CH44 и его скремблированного аналога ^{68}Ga-CH40 на ортотопической мышиной модели глиобластомы.

Целью этого примера было оценить с помощью ПЭТ-сканирования биораспределение конъюгата, нацеленного на LDLR (^{68}Ga-CH44) и его скремблированный аналог (^{68}Ga-CH40) после внутривенного введения мышам с имплантированным глиобластомой (модель ксенотрансплантата). На 21 день также проводилось сравнение с ^{68}Ga-RGD специфическим маркером интегрина, который использовался в нескольких клинических исследованиях глиобластомы.

Материалы

Радиоактивная метка

CH44 и CH40 были мечены радиоактивным изотопом с использованием хлорида ^{68}Ga. Галлий был получен в форме $^{68}Ga^{3+}$ с использованием промышленного генератора ^{68}Ge/^{68}Ga на основе TiO_2 (Обнинск). Реакцию радиоактивной метки проводили путем взаимодействия 20 мкг CH44 и 40 мкг CH40 с 74-148 МБк (2-4 мКи) ^{68}Ga в 200 мкл аммоний-ацетатного буфера (4M, pH 6) при 25°C в течение 15 минут.

Удельная активность, полученная для ^{68}Ga-CH44 и ^{68}Ga-CH40, составила 12,5 Бк/ммоль и 5,5 Бк/моль, соответственно. Удельная активность для ^{68}Ga-RGD составила 7,35 Бк/ммоль.

Имплантация опухоли

Исследования на животных выполняли в соответствии с протоколами, утвержденными Экс-Марсельским этическим комитетом (комитет 14). Шестинедельного самца голой мыши BALB/c были получены от компании Charles River Inc. Мышам имплантировали в стриатум головного мозга (1 мм впереди, 2 мм сбоку от брегмы на глубину 3 мм) клетки U87MG (5×10^5) в 5 мкл PBS. Мышей использовали для экспериментов по визуализации в J14 и J21 после инъекции, с ожидаемым объемом 9 и 53 мм^3, соответственно.

Путь введения, доза и схема эксперимента

Животные получали испытуемое вещество внутривенным однократным болюсом в дозе 8±4 МБк 68Ga-CH44 и 68Ga-CH40.

Мышам (n = 6) имплантировали клетки глиобластомы U87MG. На 14 день после имплантации животным вводили внутривенно с интервалом в 24 часа ^{68}Ga-CH44 и ^{68}Ga-CH40, соответственно. На 21 день после имплантации животным вводили внутривенно с интервалом 24 часа и 72 часа ^{68}Ga-CH44, ^{68}Ga-CH40 и ^{68}Ga-RGD, соответственно

После каждого введения биораспределение в раке глиобластомы и других тканях

оценивали с использованием ПЭТ-визуализации.

ПЭТ-сканирование

Голым мышам (n = 6) внутривенно вводили 8±4 МБк ^{68}Ga-CH44, и ПЭТ/КТ сканировали через 1 час после инъекции (п. и.). Исследования ПЭТ и ПЭТ/КТ проводили на сканере моделей грызунов microPET/microCT (nanoPET/CT®, Mediso). Анестезию индуцировали 5% изофлураном и поддерживали на уровне 1,5%. Для улучшения качества изображения было получено 20 миллионов событий совпадения на мышь для каждого статического сканирования ПЭТ-излучения (энергетическое окно, 400-600 кэВ; время: 20 минут для одного поля зрения). Для ПЭТ/КТ с двойной модальностью были получены КТ-изображения (35 кВп, время экспозиции 350 нс и средний зум), и анатомическая регистрация, а также ослабление коррекции были применены к соответствующим ПЭТ-сканам. Через шесть часов после первой инъекции той же группе голых мышей было введено 8±4 МБк ^{68}Ga-H40, и через 1 час после инъекции было получено сканирование ПЭТ/КТ, эта серия данных составила контрольную группу.

Результаты

ПЭТ-визуализация

Получение изображений было выполнено на 14 день для ^{68}Ga-CH44 и ^{68}Ga-CH40 и 21 день для ^{68}Ga-CH44, ^{68}Ga-CH40 и ^{68}Ga-RGD. Изображения для 4 из 6 мышей показали сигнал ^{68}Ga-CH44 на 14 день и отсутствие значимого сигнала для ^{68}Ga-CH40 на 16 день (фиг. 11A и 11B, соответственно). На 21 день все 6 мышей показали высокий сигнал ^{68}Ga-CH44, значительно более интенсивный, чем слабый сигнал ^{68}Ga-CH40 или ^{68}Ga-RGD (фиг. 11C, 11D, 11E, соответственно). Был проведен анализ соотношения опухоли и контраста, чтобы количественно оценить сигнал визуализации. Количественное определение показывает, что ^{68}Ga-CH44 накапливается более значительно, чем ^{68}Ga-CH40 или ^{68}Ga-RGD (примерно в 4 раза) (фиг. 12).

Вывод

Эксперименты показали четкую и селективную визуализацию и маркировку рака глиобластомы с помощью ^{68}Ga-CH44 на 21 день.

Пример 12. ПЭТ-визуализация ^{68}Ga-CH44 и ^{68}Ga-MG04 в подкожной мышиной модели рака надпочечника.

Целью этого примера было оценить и сравнить с помощью ПЭТ-сканирования биораспределение двух конъюгатов, нацеленных на LDLR, один с клеткой NODAGA (^{68}Ga-CH44) и один с клеткой DOTA и без спейсера (S) (^{68}Ga-MG04) после внутривенного введения мышам, которым имплантирована подкожная модель рака надпочечника (модель ксенотрансплантата).

Материалы

Радиоактивная метка

CH44 и MG04 были мечены радиоактивным изотопом с использованием хлорида ^{68}Ga. Галлий был получен в форме $^{68}Ga^{3+}$ с использованием промышленного генератора ^{68}Ge/^{68}Ga на основе TiO_2 (Обнинск). Реакцию радиоактивной метки проводили путем взаимодействия 20 мкг CH44 с ^{68}Ga в 200 мкл аммоний-ацетатного буфера (4M, pH 6) при 25°C в течение 15 минут. Реакцию радиоактивной метки проводили путем взаимодействия 20 мкг MG04 с ^{68}Ga в 200 мкл аммоний-ацетатного буфера (pH 4) при 100°C в течение 10 минут.

Удельная активность, полученная для ^{68}Ga-CH44 и ^{68}Ga-MG04, составила 331,3±10,5 МБк/г и 449,7±148,1 МБк/г, соответственно. Комплексообразование составило 91±16,9% для ^{68}Ga-MG04 и 97±1,4% для ^{68}Ga-CH44.

Имплантация опухоли

Исследования на животных проводили в соответствии с протоколами, утвержденными Университетом Клермон-Овернь. Четырехнедельных самцов голых мышей BALB/c получали от компании Charles River Inc. Мышам имплантировали подкожно в нижней части шеи клетки NCI-H295R (7×10^6) в 150 мкл полной среды, содержащей 50% Matrigel (Corning). Мышей использовали для экспериментов по визуализации, когда опухоли достигали объема, составляющего 200-400 мм^3.

Путь введения, доза и схема эксперимента

Животные получали испытуемое вещество внутривенным однократным болюсом в дозе 21,6±3,6 МБк ^{68}Ga-CH44 или ^{68}Ga-MG04 в объеме 150,8±40,3 мкл.

Шести мышам были имплантированы клетки рака надпочечников NCI-H295R. На 48 день после имплантации животным вводили внутривенно с интервалом 48 часов ^{68}Ga-CH44 и ^{68}Ga-MG04, соответственно. После каждого введения биораспределение в ксенотрансплантате рака надпочечника и других тканях оценивали с использованием ПЭТ-визуализации.

ПЭТ-сканирование

Группам (n = 2) голых мышей внутривенно вводили 21,6±3,6 МБк ^{68}Ga-CH44, и ПЭТ/КТ были получены через 1 ч после инъекции (п. и.). Исследования ПЭТ и КТ проводили на модели грызунов microPET (eXplore Vista, GE Healthcare) и на модели грызунов microCT (eXplore CT120, GE Healthcare). Анестезию индуцировали 5% изофлураном и поддерживали на уровне 1,5%. Чтобы улучшить качество изображения, было получено 20 миллионов событий совпадения на мышь для каждого статического сканирования ПЭТ-излучения (энергетическое окно, 250-700 кэВ; время: 5 минут для

одного поля зрения). Для ПЭТ/КТ с двойной модальностью были получены КТ-изображения (70 кВп, время экспозиции 32 мс и средний зум), и анатомическая регистрация, а также ослабление коррекции были применены к соответствующим ПЭТ-сканам. Через сорок восемь часов после инъекции ^{68}Ga-CH44 той же группе голых мышей было введено 21,6±3,6 МБк ^{68}Ga-MG04, и результаты сканирования PET/CT были получены через 1 час после инъекции (п. и.), эта серия сбора составила вторую группу.

Результаты

ПЭТ-визуализация

Получение изображения было выполнено на 48 день для ^{68}Ga-CH44. Через 48 часов было получено изображение для ^{68}Ga-MG04. В дни 48 (фиг. 13A) и 50 (фиг. 13B) на изображениях было показано значительное накопление ^{68}Ga-CH44 и ^{68}Ga-MG04 (желтая стрелка = опухоль, синяя стрелка = почка). Кроме того, поглощение опухоли для ^{68}Ga-MG04 на 73% выше по сравнению с ^{68}Ga-CH44. Изображения отображаются с одинаковым порогом (SUVmin = 0; SUVmax = 1). SUV (стандартизированное значение накопления):

Вывод

$$SUV = \frac{\text{средняя активность ROI(Mbq / г)}}{\text{Инъецированная доза (MBq / масса тела в граммах)}}$$

где MBq = мегаБеккерель и г= грамм

Эксперименты показали четкую и избирательную визуализацию и маркировку рака надпочечников с двумя молекулами, ^{68}Ga-MG04 и ^{68}Ga-CH44, с преимуществом по опухолевому накоплению для ^{68}Ga-MG04 (73%).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгированное соединение формулы:

M-C-P ,

в которой

M представляет собой фармацевтически приемлемый маркер,

C представляет собой хелатор, который образует хелат с M, и

P представляет собой пептид или псевдопептид, имеющий не более 30 аминокислотных остатков и способный связывать рецептор липопротеинов низкой плотности (LDLR),

для применения в способе мечения и/или выявления раковых клеток у субъекта путем введения конъюгированного соединения субъекту и анализа наличия и/или количества маркера.

2. Конъюгированное соединение для применения по п. 1, где указанное соединение представляет собой мультимер, содержащий несколько мономеров формулы (I).

3. Конъюгированное соединение для применения по п. 1 или 2, где P содержит аминокислотную последовательность (II):

A1-Met-A2-Arg-Leu-Arg-A3-A4 (II),

в которой A1 и A4 независимо представляют собой цистеин или его аналог или изостер, A2 представляет собой пролин или его аналог или изостер, и A3 представляет собой глицин или его аналог или изостер.

4. Конъюгированное соединение по п. 3, в котором A1 и A4 независимо представляют собой цистеин (Cys) или его аналог, выбранный из (D)-Cys, пенициллламина (Pen) и (D)-пенициллламина ((D)-Pen); и/или A2 представляет собой пролин (Pro) или его аналог, выбранный из пипеколиновой кислоты (Pip) и тиазолидин-4-карбоновой кислоты (Thz); и/или A3 представляет собой Gly или саркозин (Sar).

5. Конъюгированное соединение для применения по любому из предшествующих пунктов, в котором P содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из последовательностей от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 9.

6. Конъюгированное соединение для применения по любому из предшествующих пунктов, в котором M представляет собой радионуклид или флуоресцентный маркер.

7. Конъюгированное соединение для применения по п. 6, в котором M представляет собой ^{18}F или ^{68}Ga.

8. Конъюгированное соединение для применения по любому из предшествующих пунктов, в котором M связан с P ковалентной или ионной связью, непосредственно или косвенно.

9. Конъюгированное соединение для применения по любому из предшествующих пунктов, в котором хелатор C выбран из NODAGA, DOTA, DOTA-GA, NOTA и их функциональных производных.

10. Конъюгированное соединение по п. 9, в котором хелатор C связан с P через спейсер S.

11. Конъюгированное соединение для применения по любому из предшествующих пунктов, где соединение дополнительно содержит вторую нацеливающую группу T, которая связывается с молекулой, отличной от LDLR.

12. Конъюгированное соединение для применения по любому из предшествующих пунктов, в котором M представляет собой радионуклид, где способ включает следующие стадии:

a) введение конъюгированного соединения субъекту,

b) выполнение метода визуализации,

c) анализ сигнала, полученного на этапе b),

где наличие сигнала указывает на наличие раковых клеток и/или стадии развития рака у указанного субъекта.

13. Конъюгированное соединение для применения по любому из предшествующих пунктов для мечения и/или выявления раковых клеток, которые сверхэкспрессируют LDLR.

14. Конъюгированное соединение по п. 13, где рак выбран из рака поджелудочной железы, рака надпочечника или глиобластомы.

15. Конъюгированное соединение формулы (III):

M-C-S-P (III),

в которой

M представляет собой фармацевтически приемлемый радионуклид,

C представляет собой хелатор, который образует хелат с M,

S представляет собой спейсер, и

P представляет собой пептид или псевдопептид, имеющий не более 30 аминокислотных остатков и способный связывать рецептор липопротеинов низкой плотности (LDLR).

16. Конъюгированное соединение формулы:

M-C-P

в которой

M представляет собой фармацевтически приемлемый радионуклид,

C представляет собой хелатор, который образует хелат с M, и

P представляет собой пептид или псевдопептид, имеющий не более 30 аминокислотных остатков и способный связывать рецептор липопротеина низкой плотности (LDLR).

17. Конъюгированное соединение по п. 15 или 16, где соединение дополнительно содержит вторую нацеливающую группу T, которая связывается с молекулой, отличной от LDLR.

18. Конъюгированное соединение по любому из пп. 15-17, где указанное соединение представляет собой мультимер, содержащий несколько копий группы P и/или M.

19. Конъюгированное соединение по п. 18, где указанное соединение представляет собой мультимер, содержащий несколько мономеров формулы (III).

20. Конъюгированное соединение по любому из пп. 15-19, в котором P содержит аминокислотную последовательность (II):

A1-Met-A2-Arg-Leu-Arg-A3-A4 (II),

где A1 и A4 независимо представляют собой цистеин (Cys) или его аналог, выбранный из (D)-Cys, пенициллламина (Pen) и (D)-пенициллламина ((D)-Pen), и/или A2 представляет собой пролин (Pro) или его аналог, выбранный из пипеколиновой кислоты (Pip) и тиазолидин-4-карбоновой кислоты (Thz); и/или A3 представляет собой Gly или саркозин (Sar), предпочтительно P содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из последовательностей от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 9.

21. Конъюгированное соединение по любому из пп. 15-20, в котором M представляет собой маркер или радиотерапевтический агент, предпочтительно выбранный из ^{18}F, ^{68}Ga, ^{90}Y, ^{177}Lu и ^{111}In.

22. Конъюгированное соединение по любому из пп. 15-21, в котором C выбран из NODAGA, DOTA, NOTA, DOTA-GA и их функциональных производных.

23. Конъюгированное соединение по любому из пп. 15-22, которое представляет собой:

^{68}Ga-NODAGA-SEQ ID NO: 1, или

^{68}Ga-DOTA-SEQ ID NO: 1, или

^{177}Lu-DOTA-SEQ ID NO: 1, или

^{68}Ga-NODAGA-S-SEQ ID NO: 1, или

^{68}Ga-DOTA-S-SEQ ID NO: 1, или

^{177}Lu-DOTA-S-SEQ ID NO: 1,

где S представляет собой спейсер.

24. Конъюгированное соединение по любому из пп. 15-23 для применения в

способе визуализации, маркировки, обнаружения, диагностики или лучевой терапии рака.

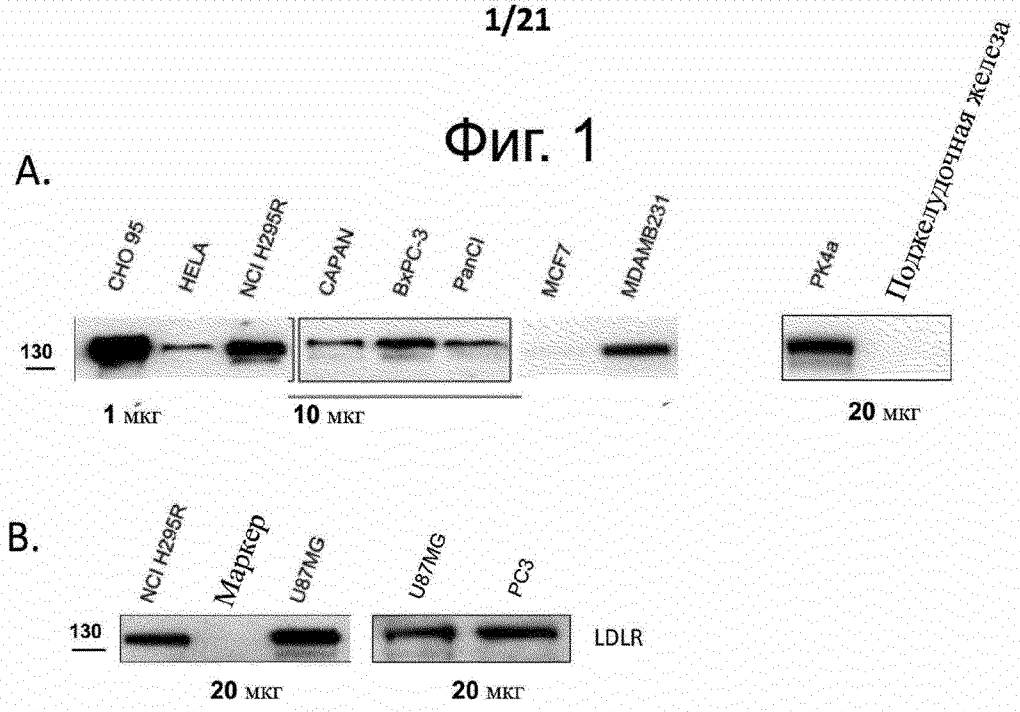
25. Композиция, содержащая конъюгированное соединение по любому из пп. 15-20 и подходящий разбавитель или наполнитель.

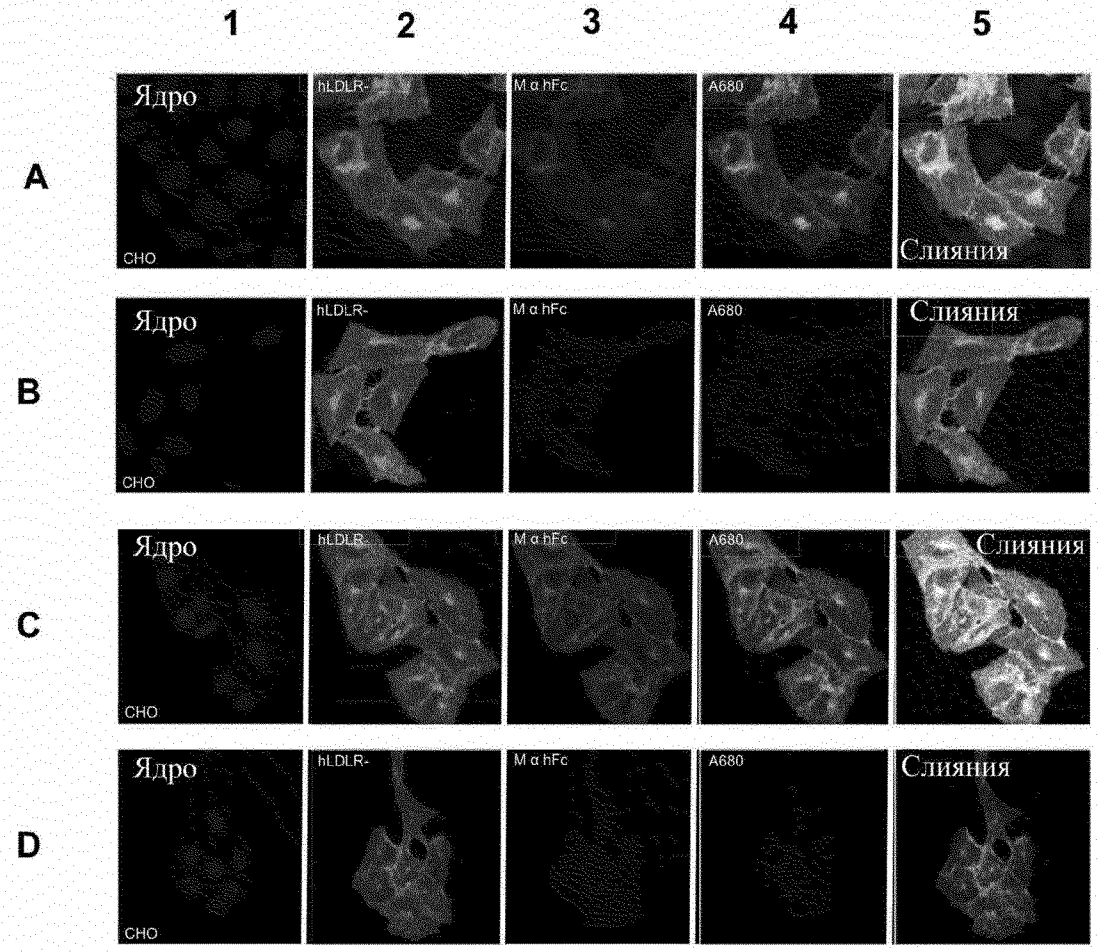
26. Конъюгированное соединение по любому из пп. 15-23, которое не содержит M.

27. Соединение VHd, которое представлено на фиг. 14.

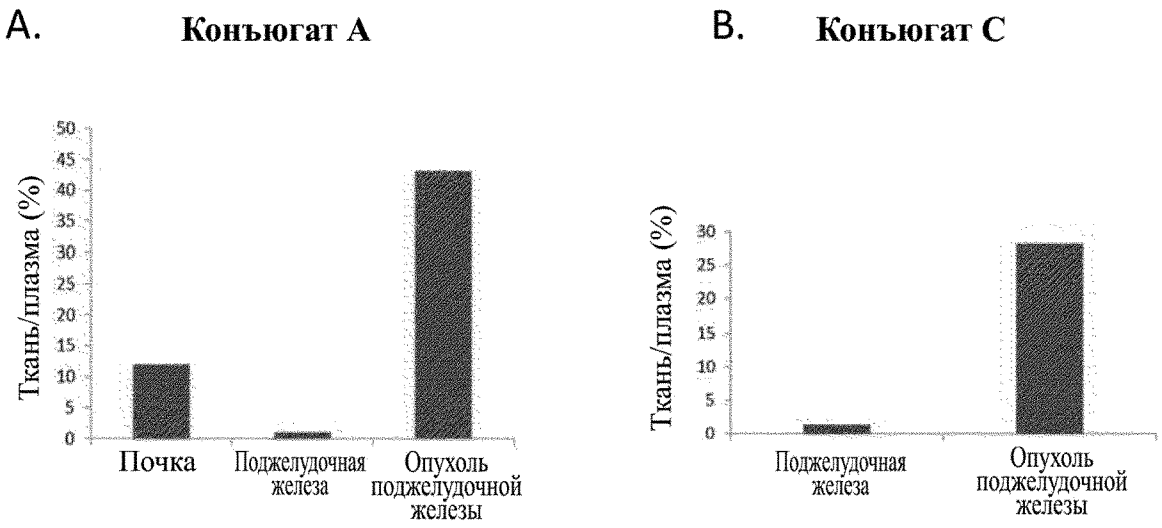
28. Соединение VHd по п.27, дополнительно содержащее радионуклид.

Фиг. 1

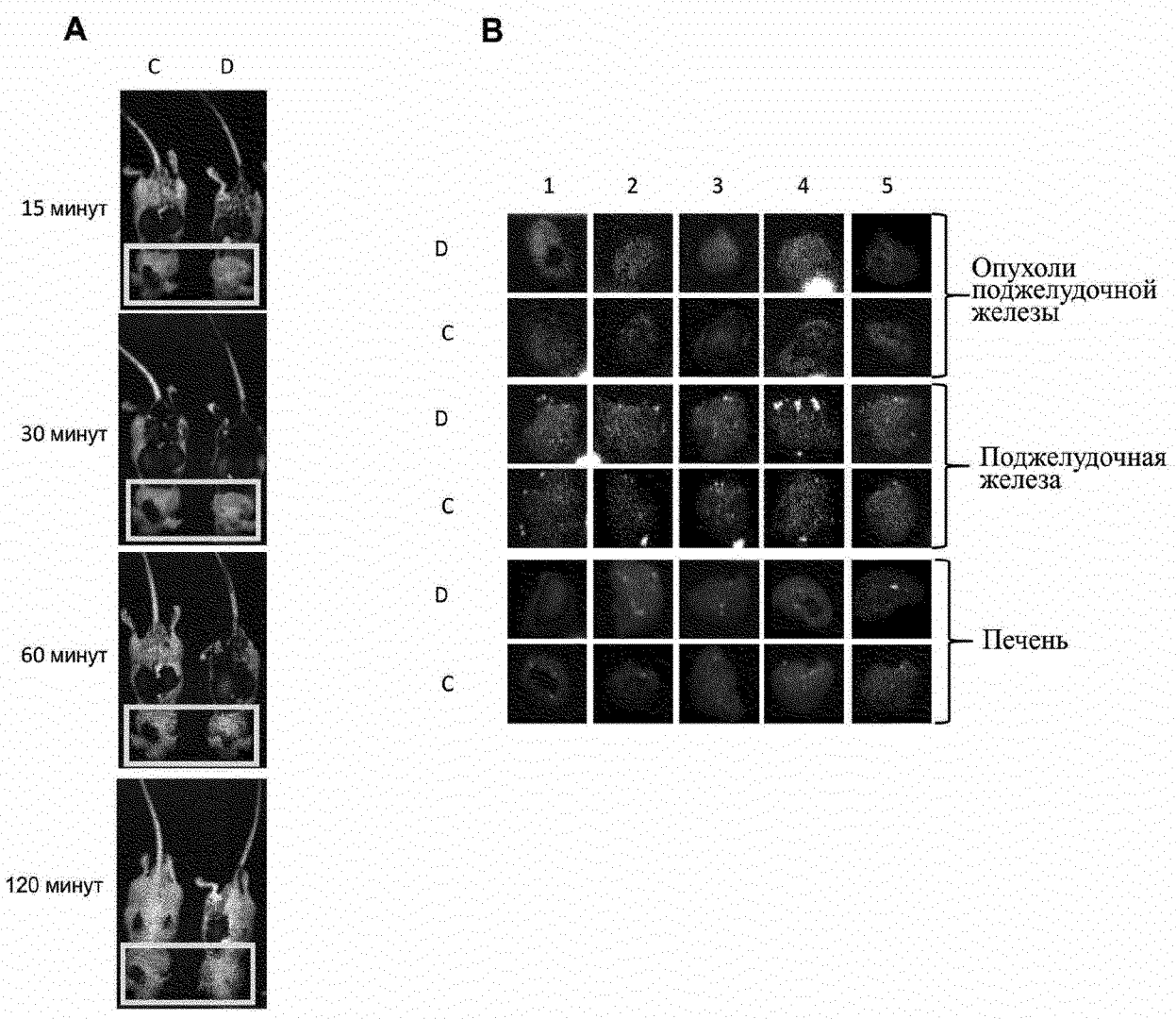

A.
CHO 95
HELA
NCI H295R
CAPAN
BxPC-3
PanCI
MCF7
MDAMB231
PK4a
Поджелудочная железа
130
1 мкг
10 мкг
20 мкг
B.
NCI H295R
Маркер
U87MG
U87MG
PC3
130
LDLR
20 мкг
20 мкг


1
2
3
4
5
A
B
C
D
Ядро
hLDLR-
M α hFc
A680
Слияния
CHO

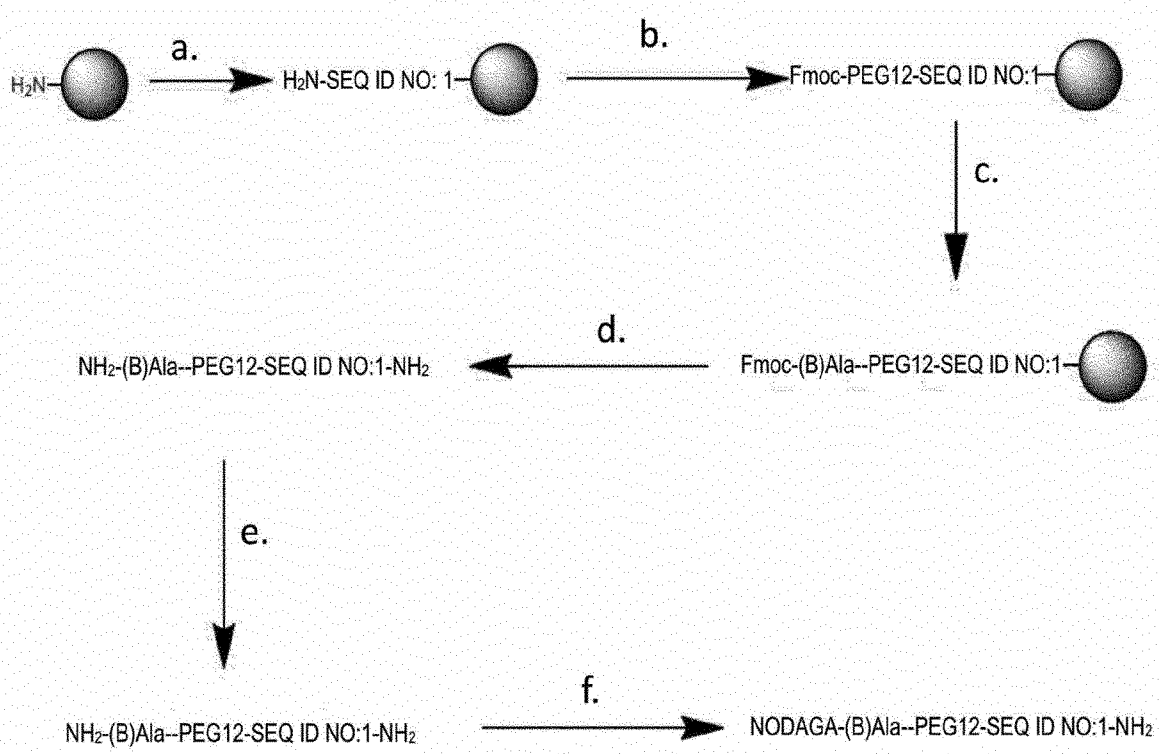
Фиг. 2


A.
Конъюгат A
Ткань/плазма (%)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Почка
Поджелудочная железа
Опухоль поджелудочной железы
B.
Конъюгат C
Ткань/плазма (%)
30
25
20
15
10
5
0
Поджелудочная железа
Опухоль поджелудочной железы

Фиг. 3

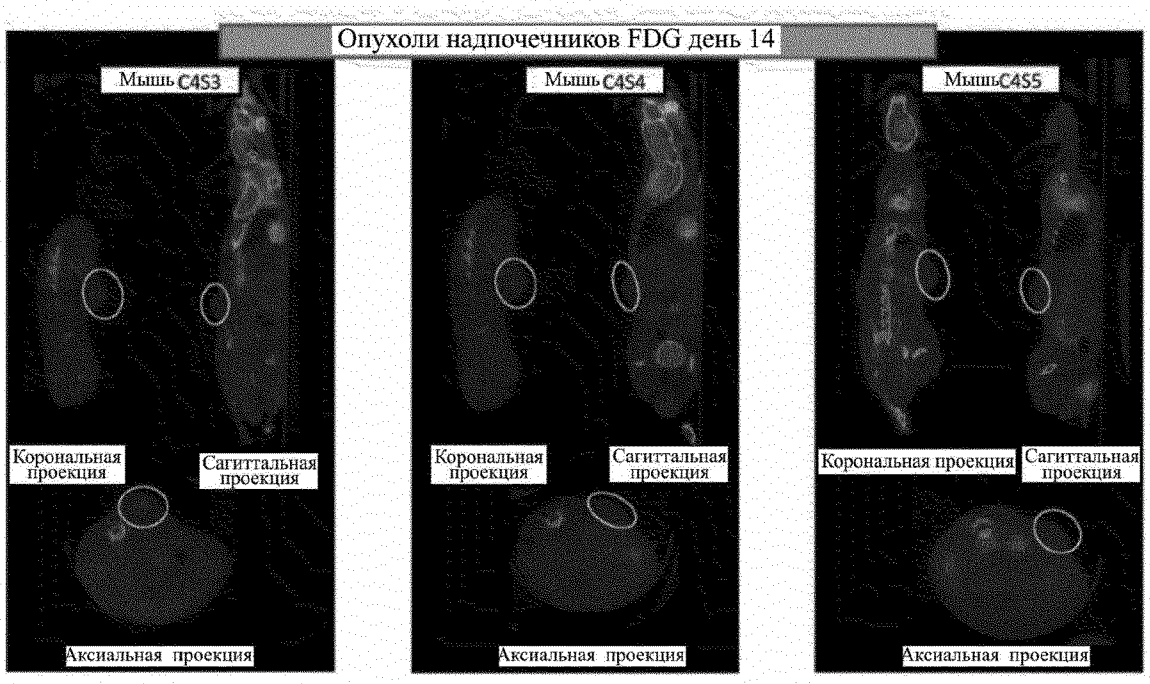

A
C
D
15 минут
30 минут
60 минут
120 минут
B
1
2
3
4
5
D
C
D
C
D
C
Опухоли поджелудочной железы
Поджелудочная железа
Печень

Фиг. 4


H2N
a.
H2N-SEQ ID NO: 1
b.
Fmoc-PEG12-SEQ ID NO:1
c.
Fmoc-(B)Ala--PEG12-SEQ ID NO:1
d.
NH2-(B)Ala--PEG12-SEQ ID NO:1-NH2
e.
NH2-(B)Ala--PEG12-SEQ ID NO:1-NH2
f.
NODAGA-(B)Ala--PEG12-SEQ ID NO:1-NH2

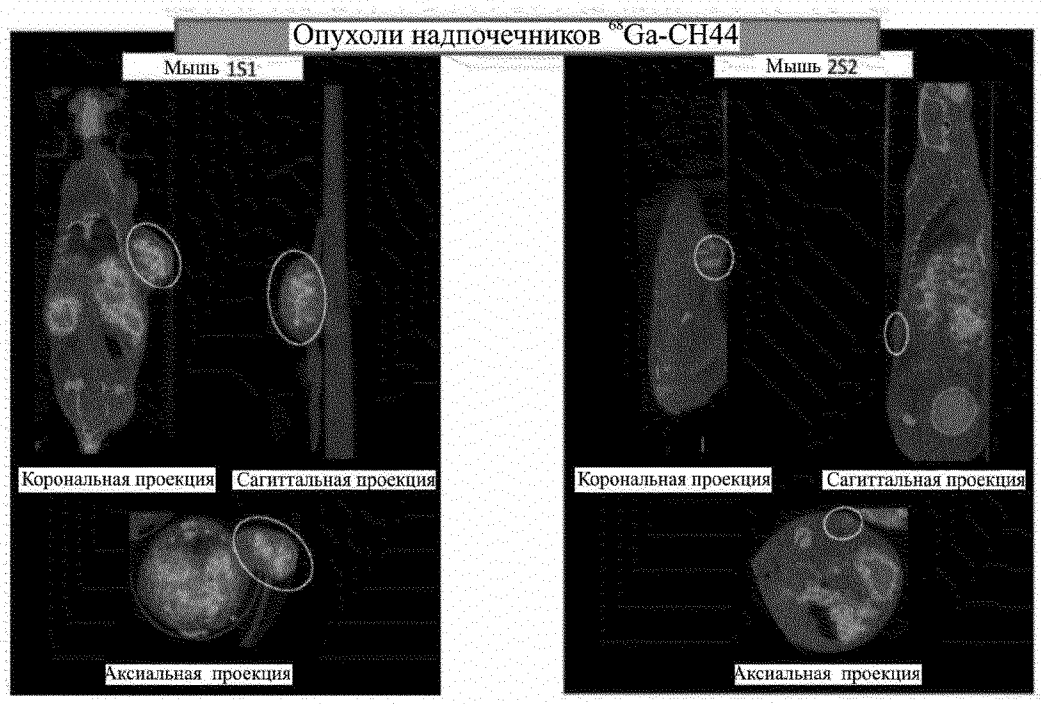
Фиг. 5

A

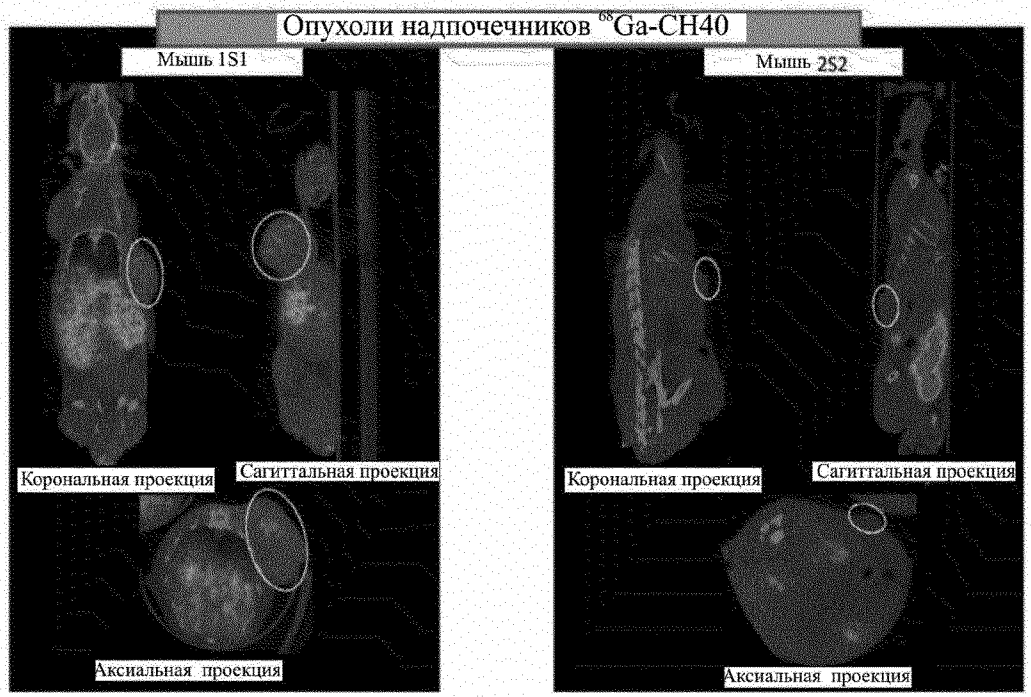

Опухоли надпочечников FDG день 14
Мышь C4S3
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция
Мышь C4S4
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция
МышьC4S5
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция

Фиг. 6A

B

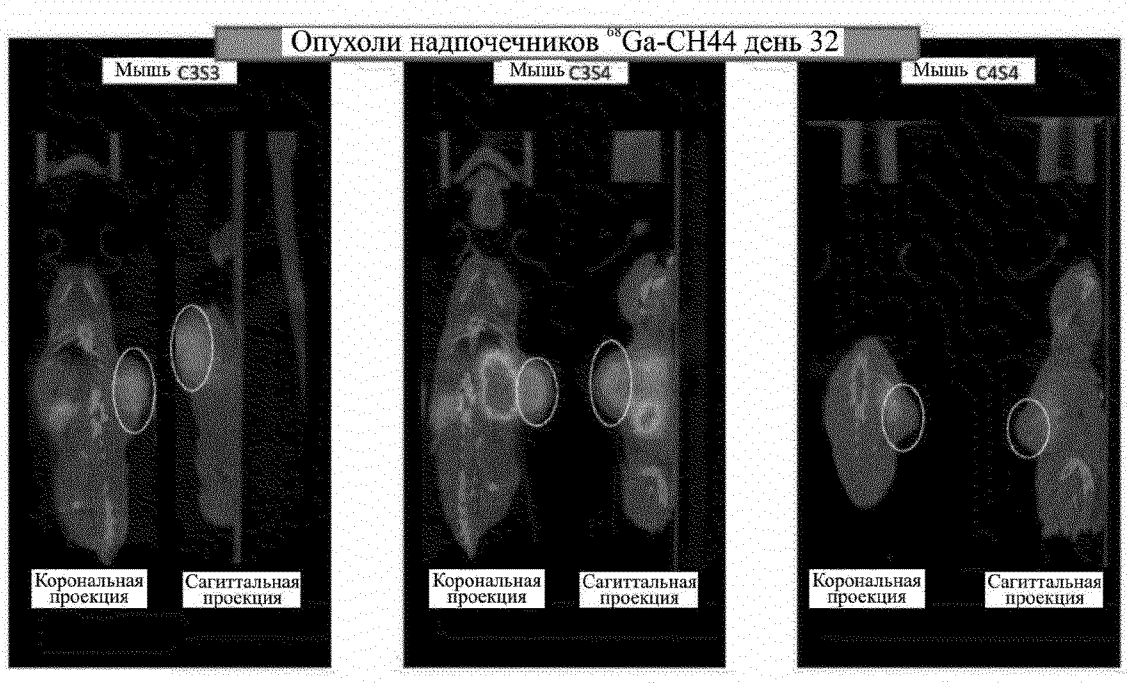

Опухоли надпочечников ^{68}Ga-CH44
Мышь 1S1
Мышь 2S2
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция

C

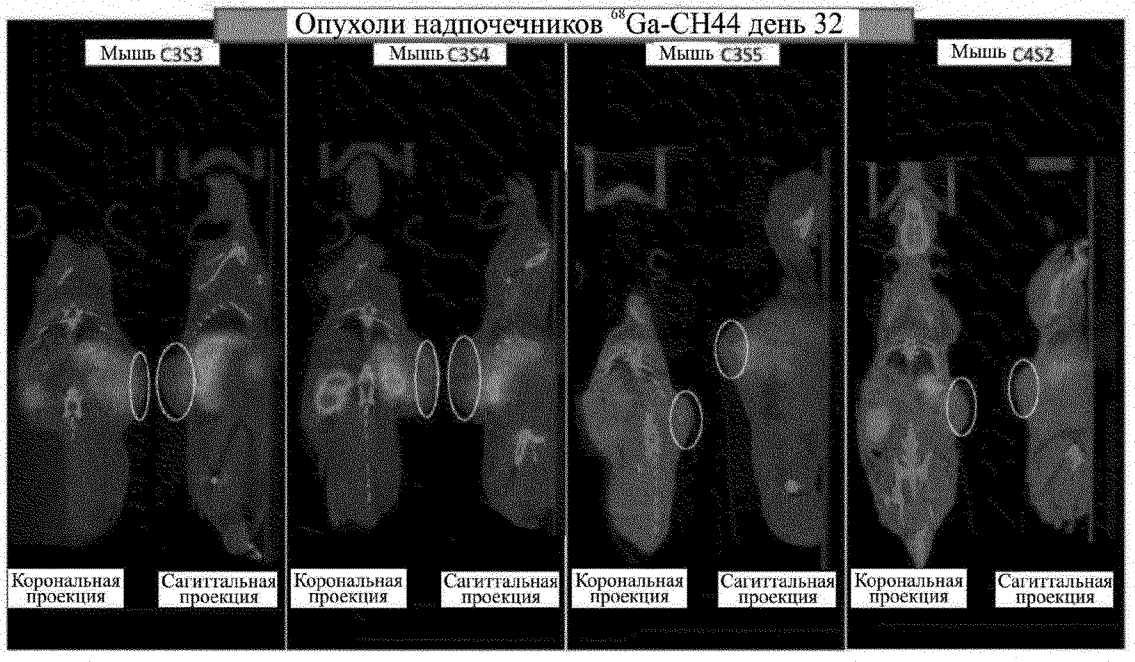

Опухоли надпочечников ^{68}Ga-CH40
Мышь 1S1
Мышь 2S2
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция

Фиг. 6 (B и C)

A

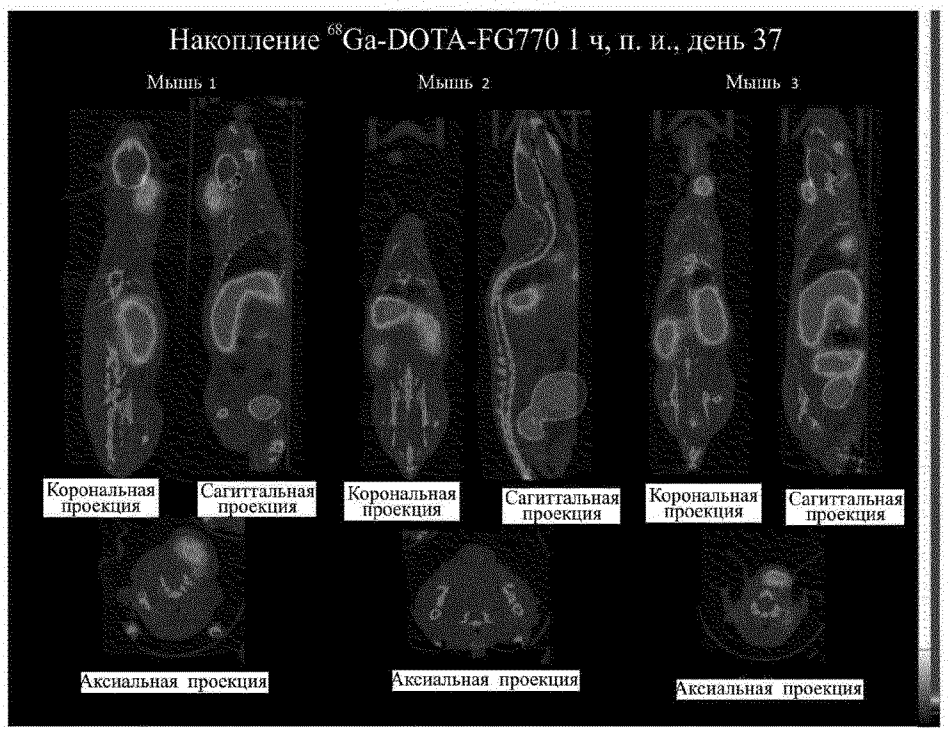

Опухоли надпочечников ^{68}Ga-CH44 день 32
Мышь C3S3
Мышь C3S4
Мышь C4S4
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Корональная проекция
Сагиттальная проекция

B

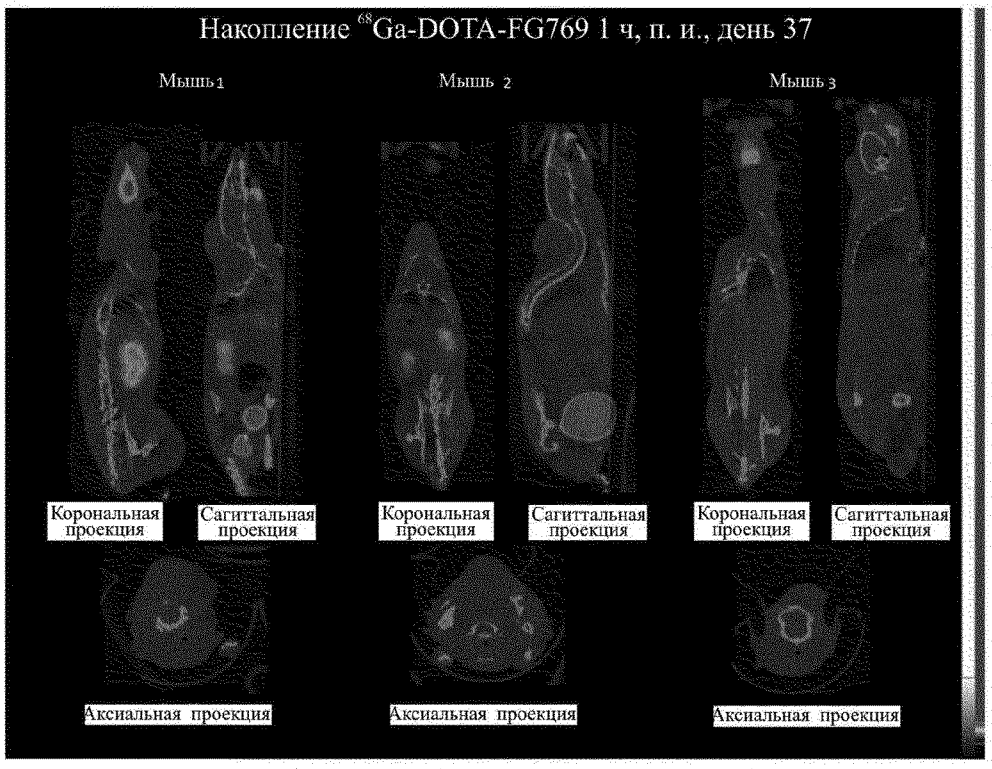

Опухоли надпочечников ^{68}Ga-CH44 день 32
Мышь C3S3
Мышь C3S4
Мышь C3S5
Мышь C4S2
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Корональная проекция
Сагиттальная проекция

Фиг. 7 (A и B)

A

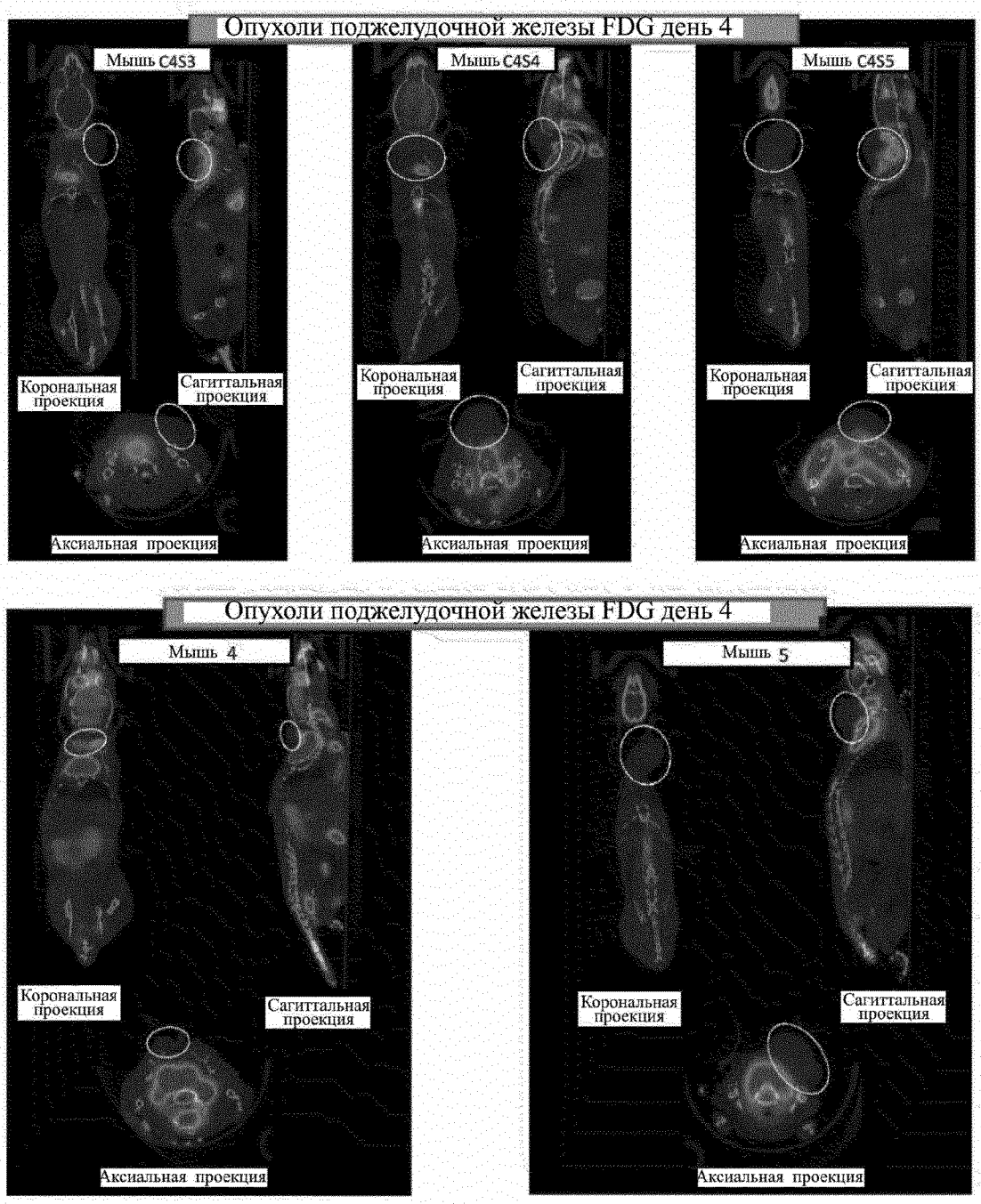

Накопление ^{68}Ga-DOTA-FG770 1 ч, п. и., день 37
Мышь 1
Мышь 2
Мышь 3
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция
Аксиальная проекция
Аксиальная проекция

B


Накопление ^{68}Ga-DOTA-FG769 1 ч, п. и., день 37
Мышь 1
Мышь 2
Мышь 3
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция
Аксиальная проекция
Аксиальная проекция

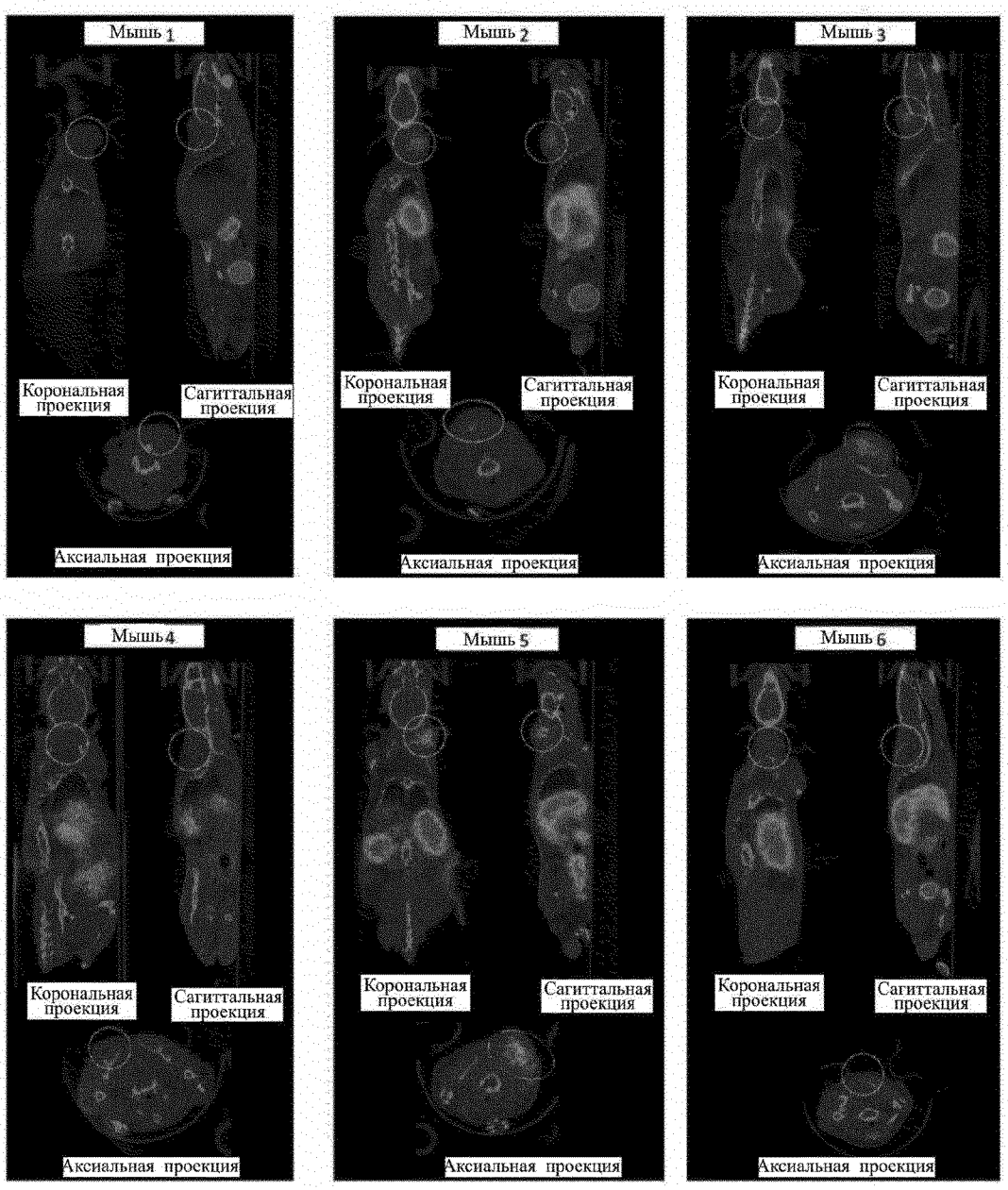
Фиг. 8 (A и B)

A


Опухоли поджелудочной железы FDG день 4
Мышь C4S3
Мышь C4S4
Мышь C4S5
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция
Опухоли поджелудочной железы FDG день 4
Мышь 4
Мышь 5
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция

Фиг. 9A

B


Мышь 1
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция
Мышь 2
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция
Мышь 3
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция
Мышь 4
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция
Мышь 5
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция
Мышь 6
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция

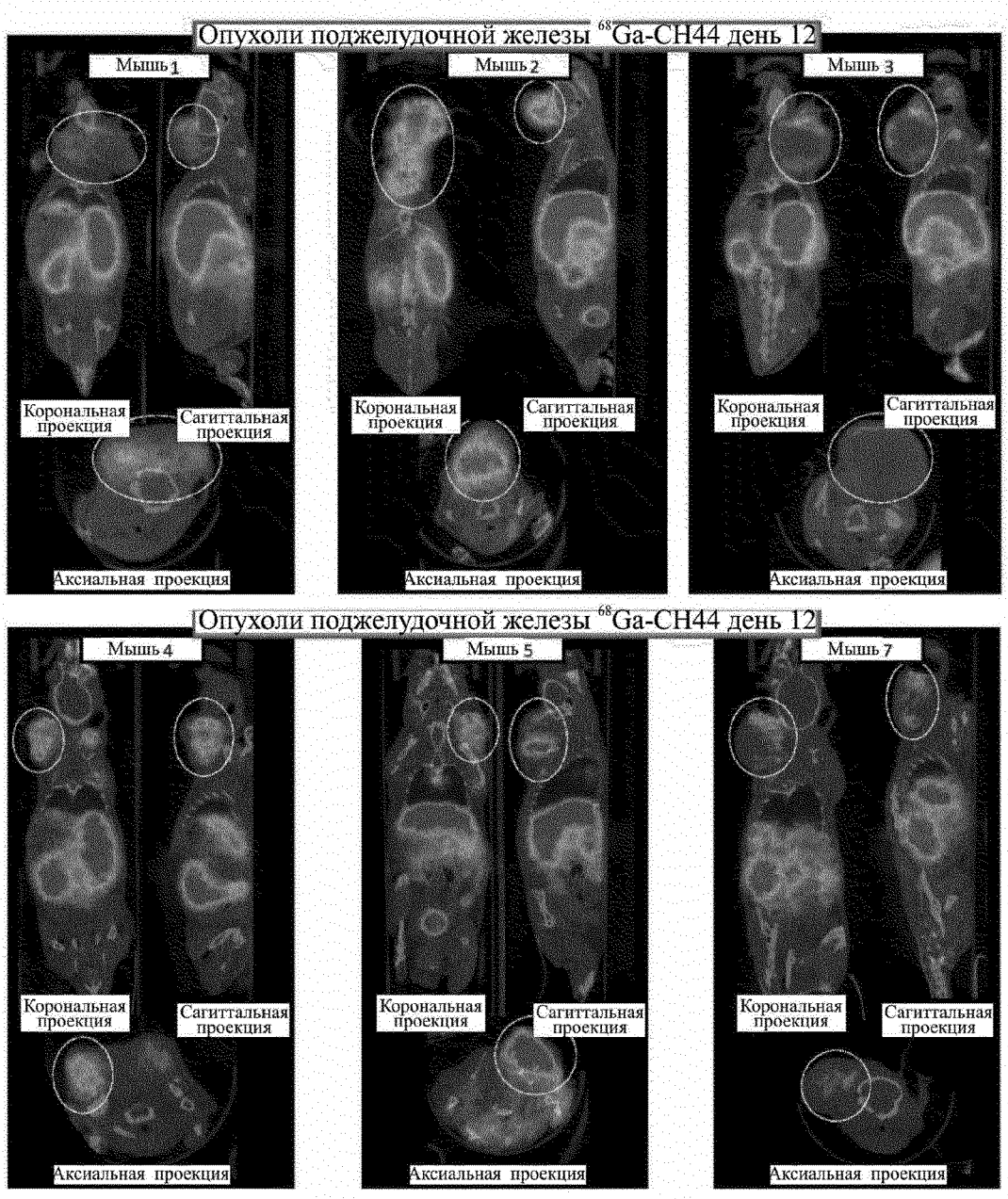
Фиг. 9B

C

Мышь 1
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция
Мышь 2
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция
Мышь 3
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция
Мышь 4
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция
Мышь 5
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция

Фиг. 9C

A


Опухоли поджелудочной железы ^{68}Ga-CH44 день 12
Мышь 1
Мышь 2
Мышь 3
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция
Опухоли поджелудочной железы ^{68}Ga-CH44 день 12
Мышь 4
Мышь 5
Мышь 7
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция

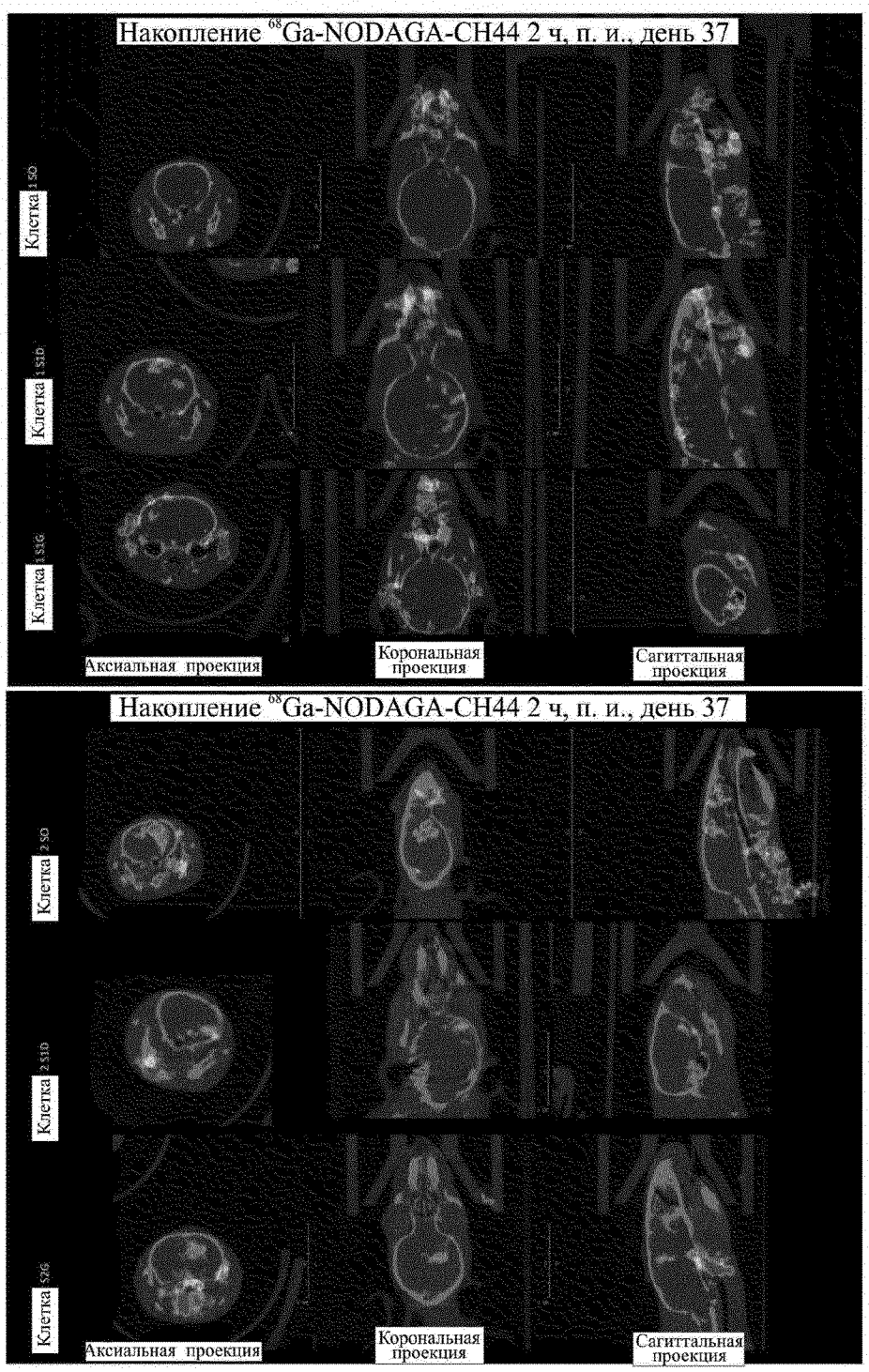
Фиг. 10A

B

Опухоли поджелудочной железы ^{68}Ga-CH40 день 12
Мышь 1
Мышь 2
Мышь 3
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция
Опухоли поджелудочной железы ^{68}Ga-CH40 день 12
Мышь 4
Мышь 5
Мышь 7
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Аксиальная проекция

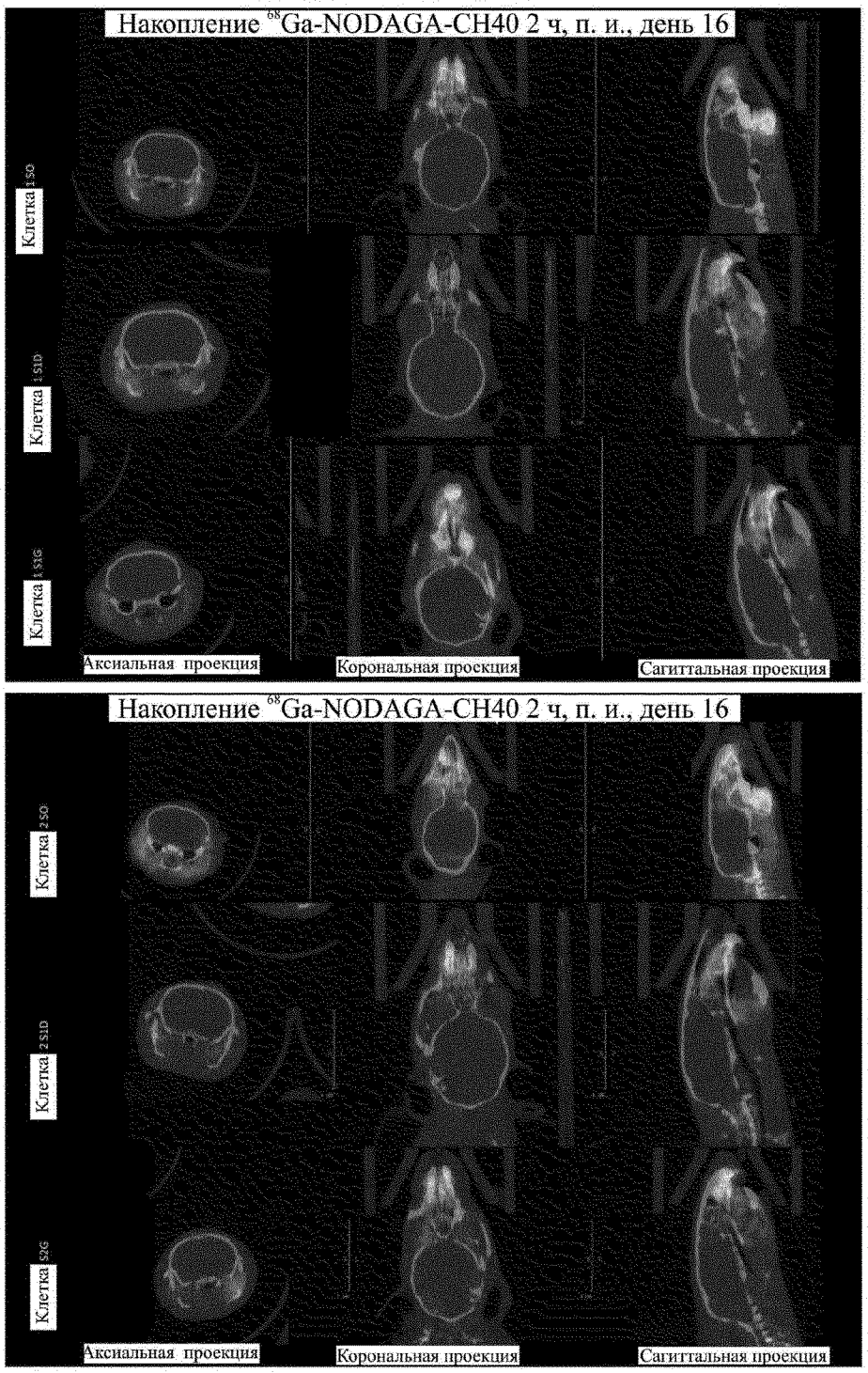
Фиг. 10B

A


Накопление ^{68}Ga-NODAGA-CH44 2 ч, п. и., день 37
Клетка 1 SO
Клетка 1 S2b
Клетка 1 S1G
Аксиальная проекция
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Накопление ^{68}Ga-NODAGA-CH44 2 ч, п. и., день 37
Клетка 2 SO
Клетка 2 S1b
Клетка S2b
Аксиальная проекция
Корональная проекция
Сагиттальная проекция

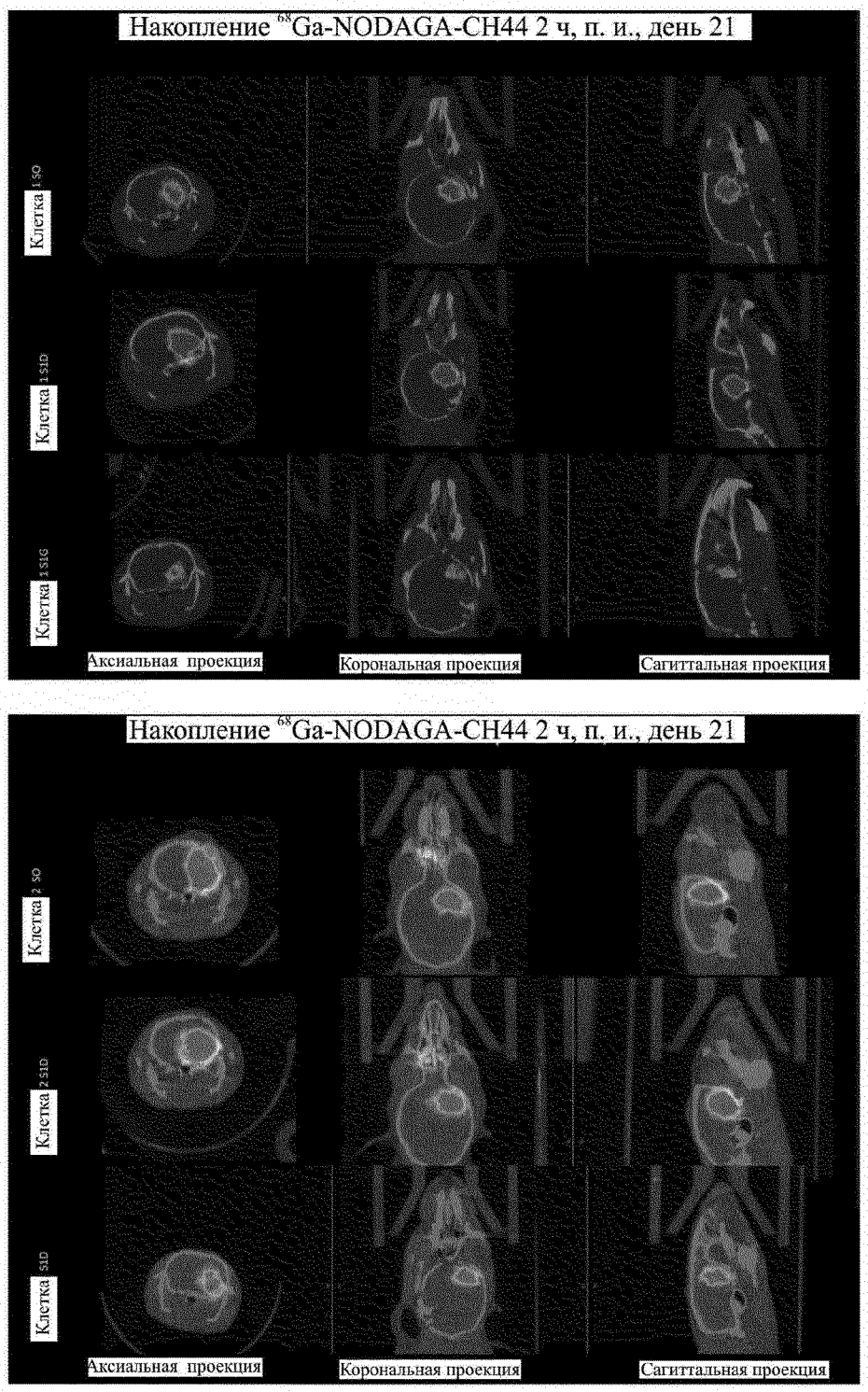
Фиг. 11A

B


Накопление ^{68}Ga-NODAGA-CH40 2 ч, п. и., день 16
Клетка 1 SD
Клетка 1 S1D
Клетка 1 S1G
Аксиальная проекция
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Накопление ^{68}Ga-NODAGA-CH40 2 ч, п. и., день 16
Клетка 2 SD
Клетка 2 S1D
Клетка S2G
Аксиальная проекция
Корональная проекция
Сагиттальная проекция

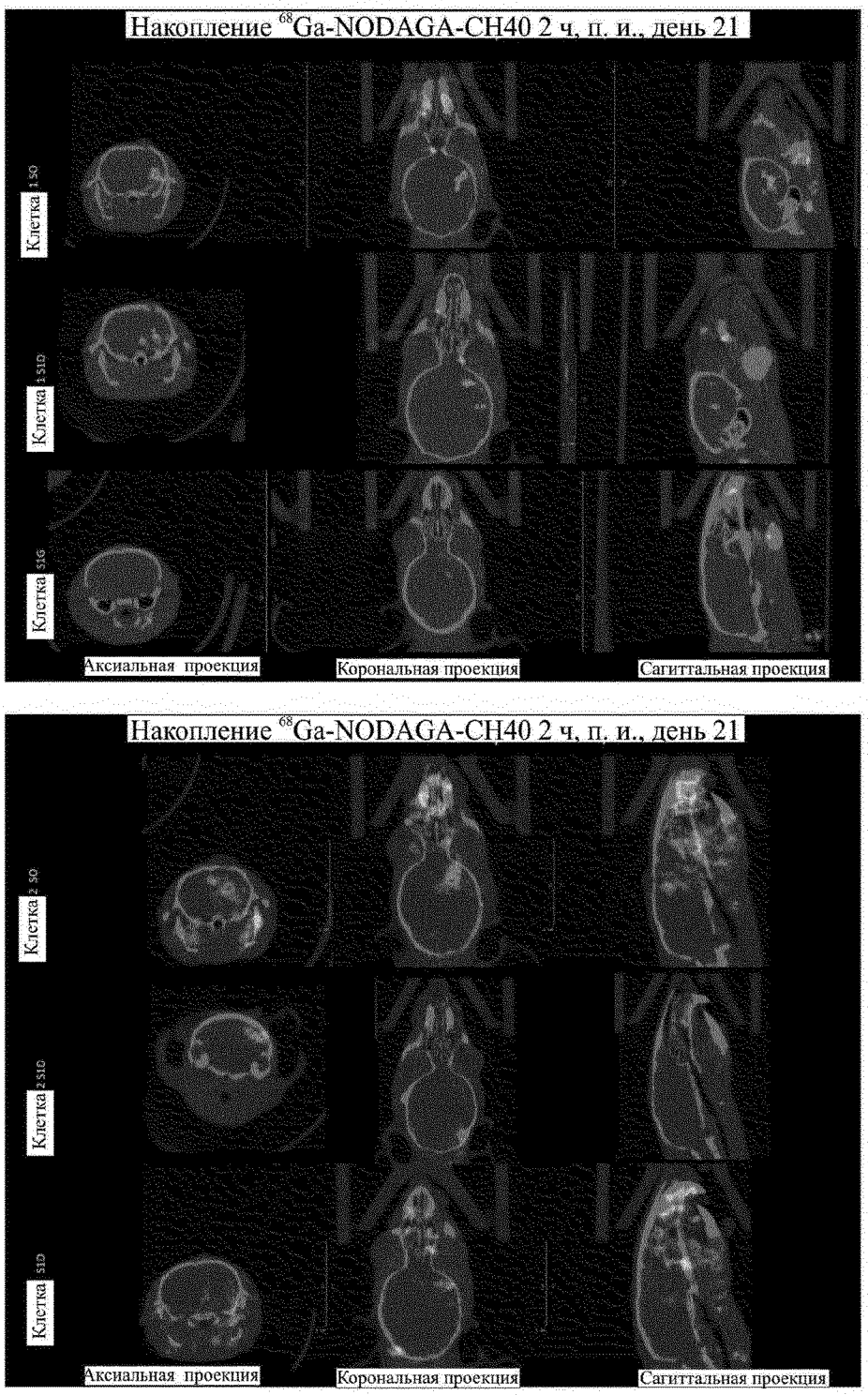
Фиг. 11B

C

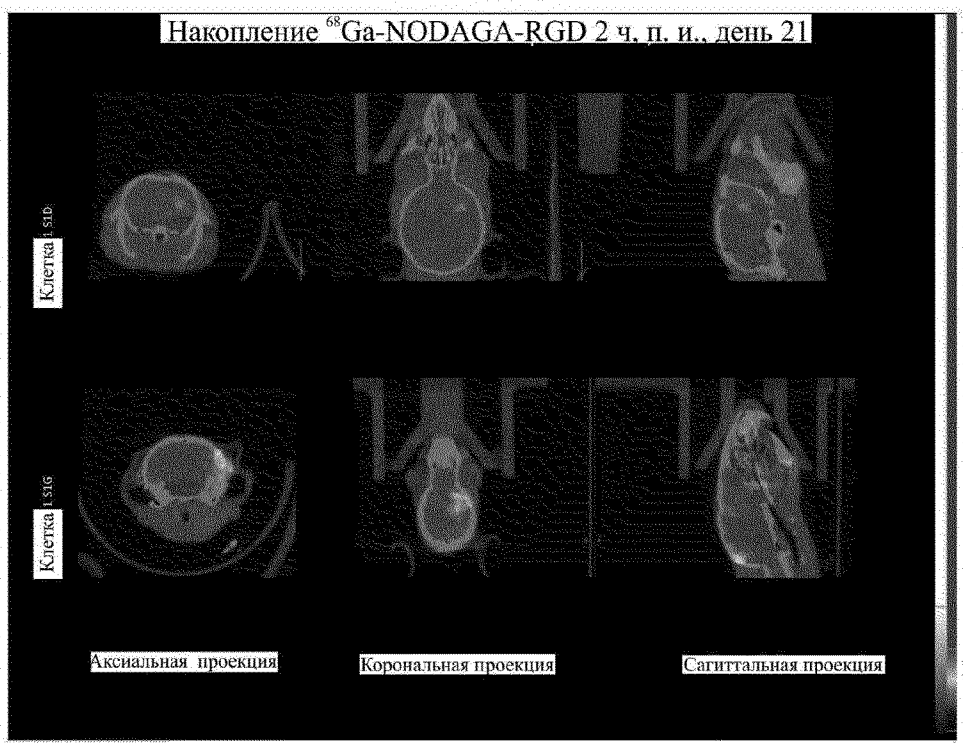

Накопление ^{68}Ga-NODAGA-CH44 2 ч, п. и., день 21
Клетка 1 SD
Клетка 1 S1D
Клетка 1 S1G
Аксиальная проекция
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Накопление ^{68}Ga-NODAGA-CH44 2 ч, п. и., день 21
Клетка 2 SD
Клетка 2 S1D
Клетка S1D
Аксиальная проекция
Корональная проекция
Сагиттальная проекция

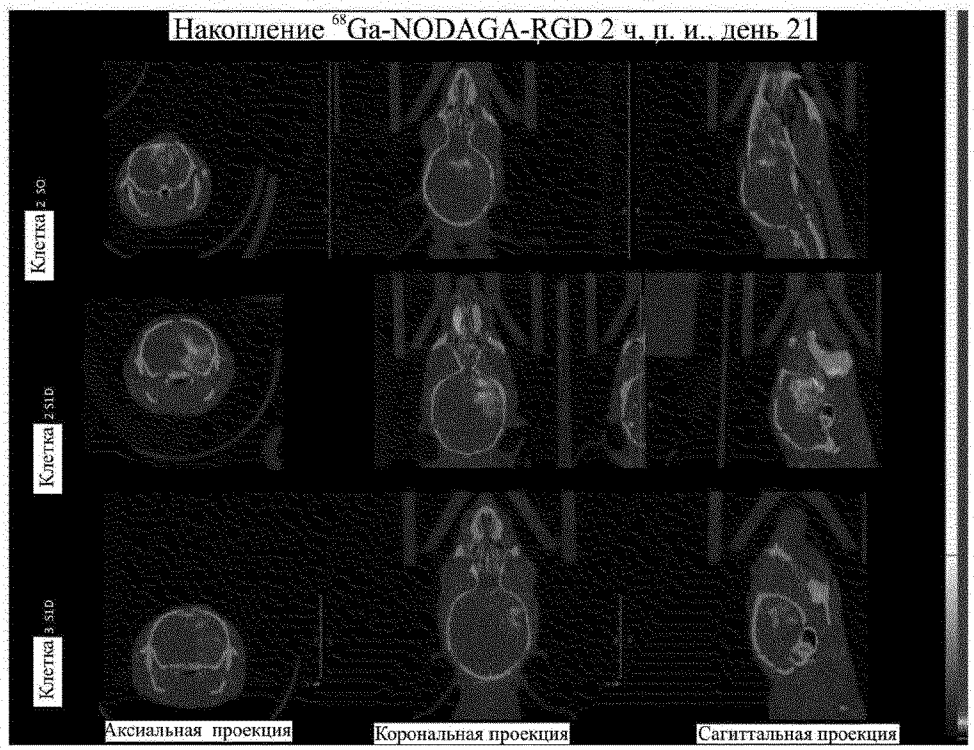
Фиг. 11C

D

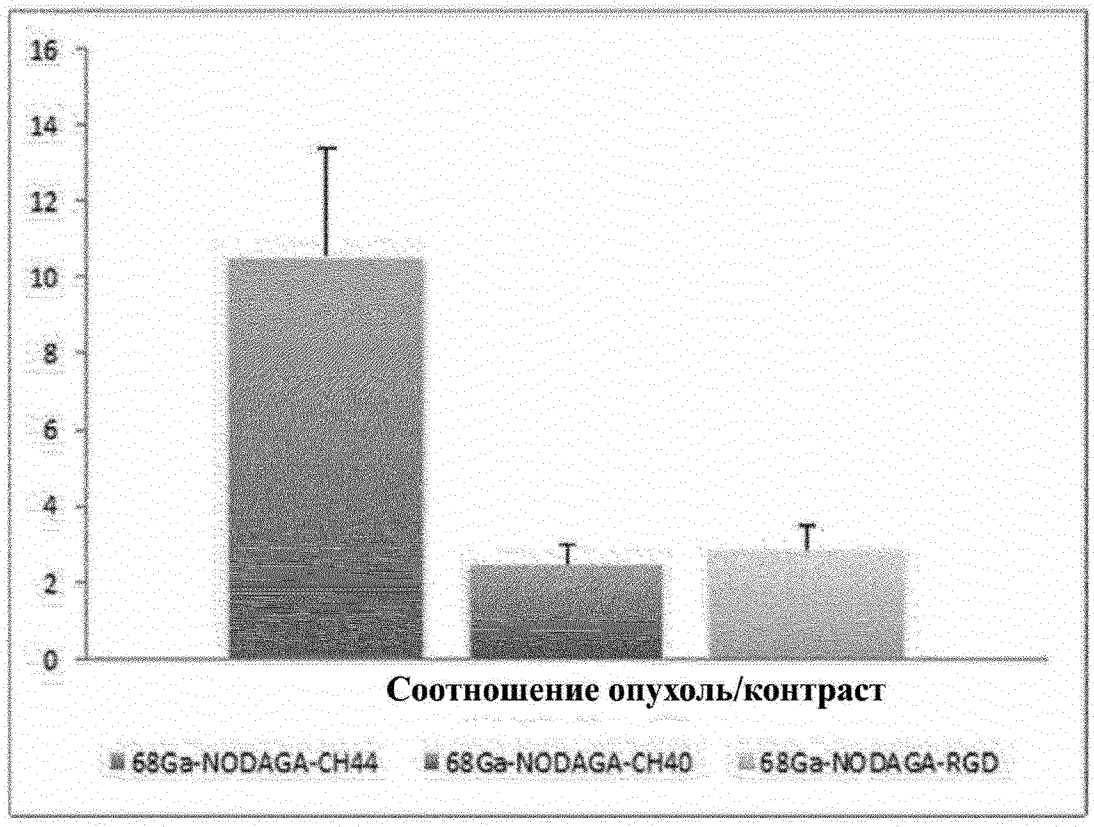

Накопление ^{68}Ga-NODAGA-CH40 2 ч, п. и., день 21
Клетка 1 SO
Клетка 1 S1D
Клетка 1 S1G
Аксиальная проекция
Корональная проекция
Сагиттальная проекция
Накопление ^{68}Ga-NODAGA-CH40 2 ч, п. и., день 21
Клетка 2 SO
Клетка 2 S1D
Клетка 2 S1D
Аксиальная проекция
Корональная проекция
Сагиттальная проекция

Фиг. 11D


Накопление ^{68}Ga-NODAGA-RGD 2 ч. п. и., день 21
Клетка 1, S1D
Клетка 1, S1G
Аксиальная проекция
Корональная проекция
Сагиттальная проекция

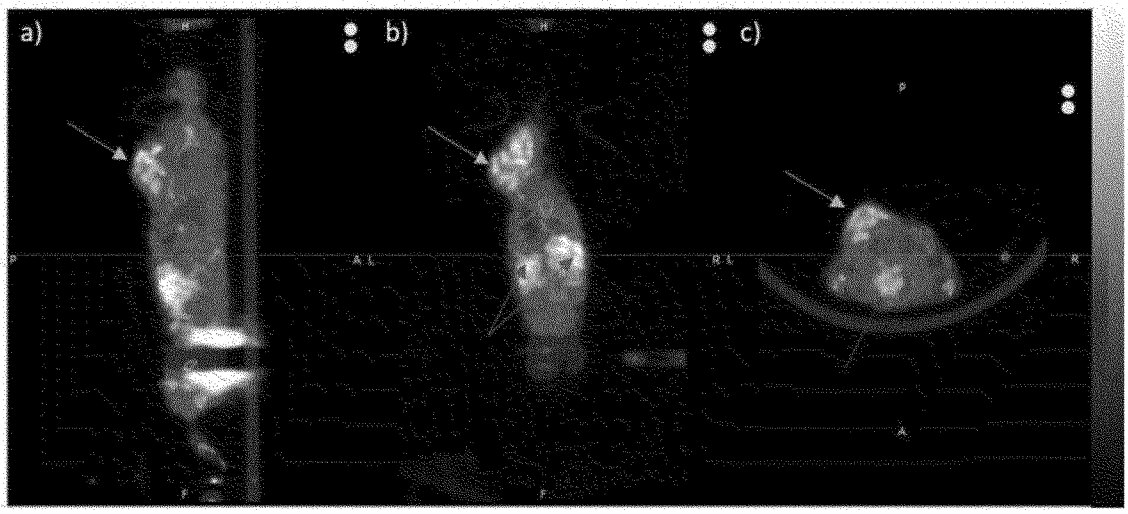

Накопление ^{68}Ga-NODAGA-RGD 2 ч. п. и., день 21
Клетка 2, SO
Клетка 2, S1D
Клетка 3, S1D
Аксиальная проекция
Корональная проекция
Сагиттальная проекция

Фиг. 11E

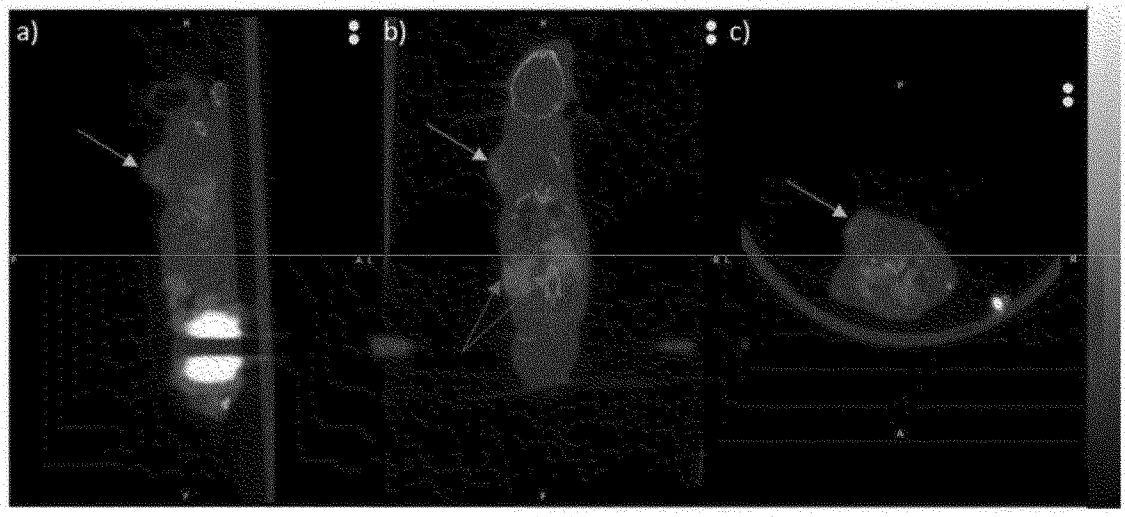

16
14
12
10
8
6
4
2
0
Соотношение опухоль/контраст
68Ga-NODAGA-CH44
68Ga-NODAGA-CH40
68Ga-NODAGA-RGD

Фиг. 12

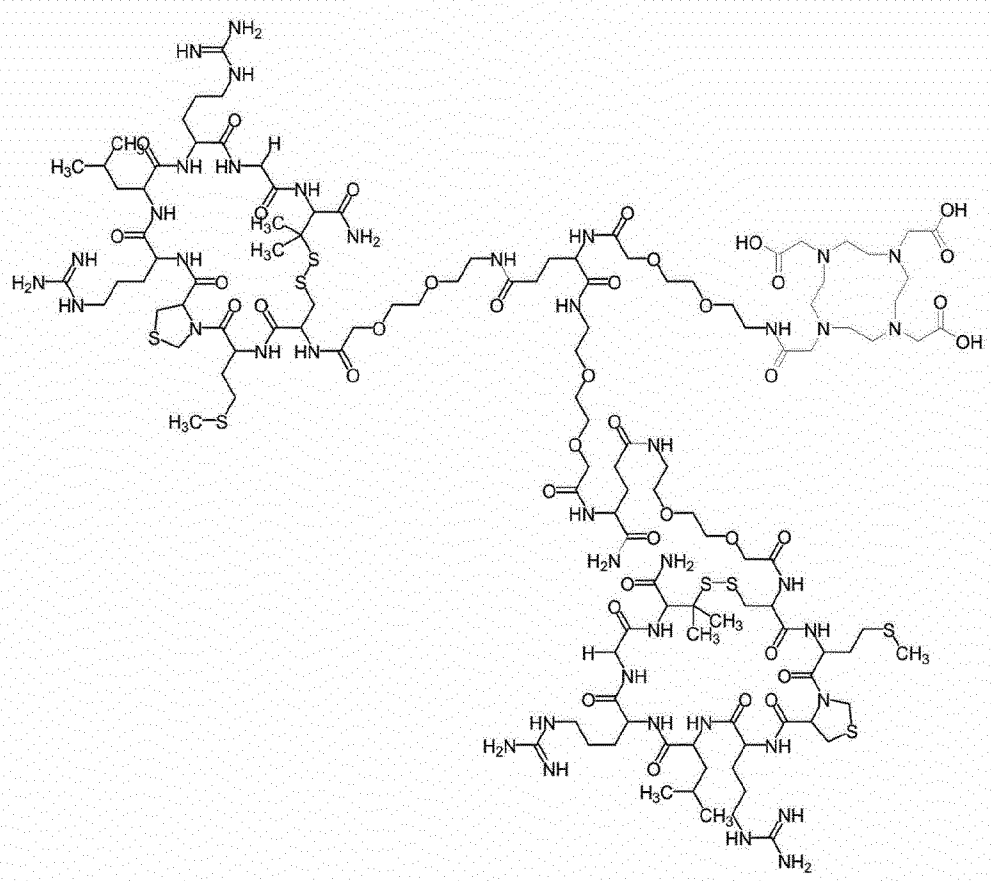
A.



B.



Фиг. 13



Фиг. 14