

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992180 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.04.23(51) Int. Cl. C07D 475/04 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
C07B 59/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2018.03.19(54) ИЗОМЕРНО ЧИСТЫЕ ^{18}F -МЕЧЕННЫЕ ТЕТРАГИДРОФОЛАТЫ

(31) 17161884.6

(32) 2017.03.20

(33) EP

(86) PCT/EP2018/056806

(87) WO 2018/172243 2018.09.27

(71) Заявитель:
МЕРК ПАТЕНТ ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:

Мозер Рудольф, Грэн Виола, Мюллер
Кристина, Шибли Роже, Аметамей
Саймон, Босс Зильван (CH)

(74) Представитель:

Веселицкая И.А., Веселицкий М.Б.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к изомерно чистым ^{18}F -меченым (6S)- или (6R)-5-метилтетрагидрофолатным радиофармацевтическим средствам, где фенильная группа в структуре фолата была заменена ^{18}F -меченым N-гетероциклом, предназначенным для применения во время диагностической визуализации *in vitro* или *in vivo* клетки или популяции клеток, экспрессирующих рецептор фолата, или для применения во время мониторинга злокачественного новообразования или воспалительных и аутоиммунных заболеваний и их лечения.

A1

201992180

201992180

A1

ИЗОМЕРНО ЧИСТЫЕ ^{18}F -МЕЧЕННЫЕ ТЕТРАГИДРОФОЛАТЫ

5 **Область техники изобретения**

Настоящее изобретение относится к применению изомерно чистых ^{18}F -меченых (6S)- или (6R)-тетрагидрофолатных радиофармацевтических средств, где фенильная группа в структуре фолата была заменена ^{18}F -меченым N-гетероциклом, во время диагностики клетки или популяции клеток, экспрессирующих рецептор фолата, и мониторинга злокачественного новообразования или воспалительных и аутоиммунных заболеваний и их лечения.

Предпосылки создания изобретения

15 Рецептор-специфическое нацеливание для доставки эффекторных фрагментов, таких как диагностические или терапевтические средства, является в значительной степени исследованной областью и, в свою очередь, оно привело к развитию неинвазивных диагностических и/или терапевтических применений в медицинской практике. В частности, в области процедур и клинических практик ядерной медицины, где применяют радиоактивные вещества, испускающие электромагнитное излучение, такое как γ -лучи, или излучение веществ, испускающих частицы, требуется селективное накопление указанных радиоактивных веществ в целевых клетках или тканях для достижения либо высокой интенсивности сигнала для визуализации специфических тканей, 20 оценки заболевания и/или мониторинга воздействия терапии, либо высокая доза излучения, для доставки достаточных доз ионизирующего излучения в определенную пораженную болезнью область, без риска радиационного поражения /радиотоксичности в других, например, здоровых тканях. Таким образом, крайне важно определить и оценить клеточноспецифические структуры и, в частности, структуры, которые представлены в случае злокачественного новообразования (т.е. опухолей) или воспалительных и аутоиммунных заболеваний, такие как рецепторы, антигены, гаптены и подобные, на которые могут специфически нацеливаться соответствующие биологические переносчики. 30

За последние два десятилетия, исследовали большое количество радиофармацевтических средств на основе фолиевой кислоты в отношении их способности визуализировать опухолевые ткани, положительные по рецептору фолата (FR) (Low, P. S., Henne, W., и Doorneweerd, D. (2008) Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases. *Acc. Chem. Res.* 41, 120–129; Philip Stewart Low, S. A. K. (2009) Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 256–262; Müller, C. (2013) Folate-Based Radiotracers for PET Imaging - Update and Perspectives. *Molecules* 18, 5005–5031, и Müller, Folate based radiopharmaceuticals for imaging and therapy of cancer and inflammation., C. *Curr Pharm Des.* 2012;18(8):1058-83). FR- α представляет собой оптимальную мишень для визуализации опухоли, поскольку он сверхэкспрессируется на различных типах эпителиального рака, таких как рак яичников, матки, почки, молочной железы, легкого и рак ободочной и прямой кишки, но при этом только ограниченно экспрессируется в здоровых тканях, включая ткани почки, хорионидного сплетения, слюнных желез, легкого и плаценты (Parker, N., Turk, M. J., Westrick, E., Lewis, J. D., Low, P. S., и Leamon, C. P. (2005) Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Anal. Biochem.* 338, 284–293.) Радиоактивные индикаторы на основе фолиевой кислоты имеют тот недостаток, что они в большой степени накапливаются в почках и других FR-положительных тканях, вследствие их высокого сродства связывания с FR- α ($IK_{50} = \sim 1$ нМ) (Müller, C. (2013) Folate-Based Radiotracers for PET Imaging - Update and Perspectives. *Molecules* 18, 5005–5031.) Более того, указанные радиоактивные индикаторы на основе фолиевой кислоты также связываются с изоформой FR- β , количество которой повышается на активированных макрофагах, вовлеченных в воспаление, с подобным высоким сродством (Nakashima-Matsushita, N., Homma, T., Yu, S., Matsuda, T., Sunahara, N., Nakamura, T., Tsukano, M., Ratnam, M., и Matsuyama, T. (1999) Selective expression of folate receptor β and its possible role in methotrexate переносе in synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 42, 1609–1616; Paulos, C. M., Turk, M. J., Breur, G. J., и Low, P. S. (2004) Folate receptor-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to activated macrophages in rheumatoid arthritis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1205–1217) Указанная неселективность может приводить к ложноположительным

результатам диагностики злокачественного новообразования или последующих исследований. Следовательно, селективное радиофармацевтическое средство на основе фолата будет иметь большое значение и интерес для уменьшения или даже для предотвращения вводящих в заблуждение результатов.

5 Однако, до недавнего времени, радиоактивным изотопом в случае визуализирующих методов исследований метили только ограниченное количество восстановленных фолатов. Vaitilingam *и др.* сообщали о производном 5,10-диметилтетрагидрофолата (ДМТГФ), которое метили ^{99m}Tc , однако, никакой информации о диастереомерном соотношении производного ДМТГФ не
10 было предоставлено (Vaitilingam, B., Chelvam, V., Kularatne, S. a., Poh, S., Ayala-Lopez, W., и Low, P. S. (2012) A Folate Receptor- α -Specific Ligand That Targets Cancer Tissue and Not Sites of Inflammation. *J. Nucl. Med.* 53, 1127–1134.) Авторы сообщали о значении K_D (константа диссоциации), составляющем 38 нМ, которое было в четыре раза выше, по сравнению с соответствующей окисленной
15 формой (ЭК20, K_D = 12 нМ). Селективность в отношении FR- α , по сравнению с FR- β , была продемонстрирована в исследованиях *in vitro* и *in vivo* с использованием FR- α -положительной опухоли и животной модели воспаления. Кроме производного ДМТГФ, Saeed *и др.* сообщали в Nuclear Medicine and Biology 39(5):697-701, январь 2012 г., о другом радиоактивном индикаторе на
20 основе восстановленного фолата, меченого углеродом-11, однако, никаких результатов исследований *in vitro* или *in vivo* не было опубликовано. Подобно Vaitilingam и др., не было предоставлено никакой информации о диастереомерном соотношении меченого радиоактивным изотопом продукта. Радиоактивный индикатор для ПЭТ визуализации на основе меченого фтором-18
25 фолата, который селективно нацеливается на связанный с опухолью FR- α , а не на FR- β в сайты воспаления, содержащие FR- β , будет представлять большой интерес для обеспечения значительной чувствительности и специфичности.

Wang и др. сообщали в Biochemical Pharmacology. т. 44. № 9. стр. 1898-1901, 1992 г, о четырехкратной разнице сродства связывания восстановленного
30 5-метил-(6R)- соотв. -(6S)-ТГФ.

Betzel и др. недавно сообщали о весьма перспективном меченом фтором-18 производном фолиевой кислоты, которое обозначается 3'-аза-2'-
[^{18}F]фторфолиевая кислота, для визуализации FR-положительной раковой ткани (Betzel, T., Müller, C., Groehn, V., Müller, A., Reber, J., Fischer, C. R., Krämer, S.

D., Schibli, R., и Ametamey, S. M. (2013), Radiosynthesis and Preclinical Evaluation of 3'-Aza-2'-[^{18}F]fluorofolic Acid: A Novel PET Radiotracer for Folate Receptor Targeting. *Bioconjug. Chem.* 24, 205–214.).

Тем не менее, хотя известные ^{18}F фолатные радиофармацевтические средства показывают весьма обнадеживающие результаты, все еще существует необходимость в соединениях, которые показывают высокую FR-альфа-специфичность, и являются подходящими для обычных применений в клинической практике, и при этом могут быть получены эффективными и универсальными способами с высоким выходом радиохимического вещества.

На сегодняшний день заявители обнаружили, что высокая специфичность по отношению к FR-альфа-положительной ткани может быть достигнута с помощью изомерно чистых производных ^{18}F -меченого тетрагидрофолата, таких как физиологическая (6R)-форма 3'-аза-2'-[^{18}F]фтор-5-метилтетрагидрофолата.

Изомерно чистые производные ^{18}F -меченого тетрагидрофолата, такие как 3'-аза-2'-[^{18}F]фтор-5-метилтетрагидрофолат, который представляет собой производное восстановленной физиологической формы фолата, связывается с FR с высоким сродством и демонстрирует в 50 раз большую селективность в отношении FR-альфа, чем соответствующее окисленное производное фолиевой кислоты. При этом радиоактивный индикатор для ПЭТ визуализации селективно нацеливается на связанный с опухолью FR-альфа, а не на FR-бета в сайты воспаления, содержащие FR-бета, и в это же время обеспечивается значительная чувствительность и специфичность. Делая вывод на основании изображения с использованием неспецифического радиоактивного индикатора для ПЭТ визуализации, который происходит от радиоактивного индикатора для ПЭТ визуализации, селективно нацеливающегося на связанный с опухолью FR-альфа, можно получить информацию о сайтах воспаления, содержащих FR-бета.

Таким образом, настоящее изобретение относится к применению изомерно чистых ^{18}F -меченых тетрагидрофолатных радиофармацевтических средств во время диагностической визуализации *in vitro* или *in vivo* клетки или популяции клеток, экспрессирующих рецептор фолата, или к применению во время мониторинга злокачественного новообразования или воспалительных и аутоиммунных заболеваний и их лечения.

Краткое описание изобретения

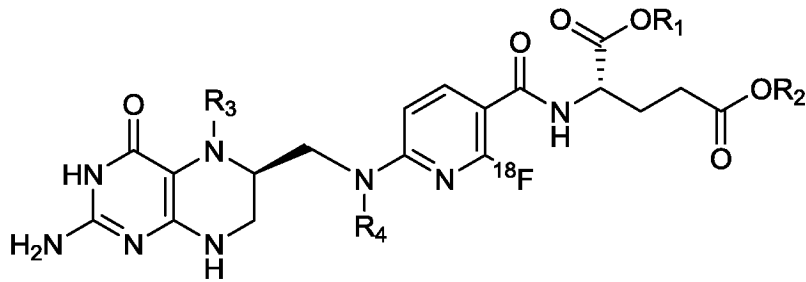
В первом аспекте настоящее изобретение относится к применению изомерно чистых ^{18}F -меченых тетрагидрофолатных радиофармацевтических средств, где фенильная группа в структуре фолата была заменена ^{18}F -меченым N-гетероциклом, во время диагностической визуализации *in vitro* или *in vivo* клетки или популяции клеток, экспрессирующих рецептор фолата, или к применению во время мониторинга злокачественного новообразования или воспалительных и аутоиммунных заболеваний и их лечения.

Предпочтительно, ^{18}F -меченые тетрагидрофолатные радиофармацевтические средства, где фенильная группа в структуре фолата была заменена ^{18}F -меченым N-гетероциклом, представлены в их изомерно чистой (6S)- или (6R)-форме.

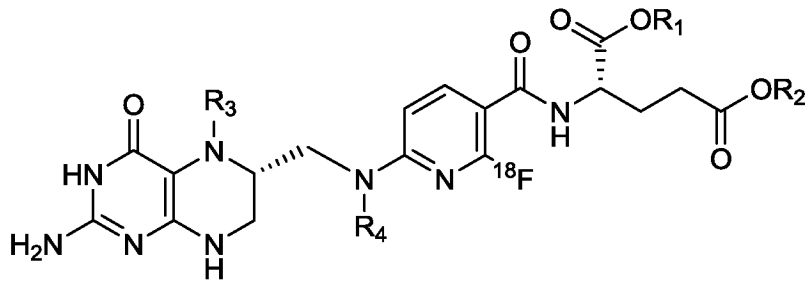
Даже более предпочтительно, изомерно чистые ^{18}F -меченые (6S)- или (6R)-тетрагидрофолатные радиофармацевтические средства, где фенильная группа в структуре фолата была заменена ^{18}F -меченым N-гетероциклом, представляют собой изомерно чистые ^{18}F -меченые 5-метил-(6S)-тетрагидрофолатные или изомерно чистые ^{18}F -меченые 5-метил-(6R)-тетрагидрофолатные радиофармацевтические средства, где фенильная группа в структуре фолата была заменена ^{18}F -меченым N-гетероциклом.

В отдельных вариантах осуществления изомерно чистое ^{18}F -меченое (6S)- или (6R)-тетрагидрофолатное радиофармацевтическое средство, где фенильная группа в структуре фолата была заменена ^{18}F -меченым N-гетероциклом, представляет собой изомерно чистый 3'-аза-2'-[^{18}F]фтор-5-метил-(6S)-тетрагидрофолат или изомерно чистый 3'-аза-2'-[^{18}F]фтор-5-метил-(6R)-тетрагидрофолат.

В одном особом варианте осуществления, обеспечивают соединение формулы Ia или Ib, предназначенное для применения во время диагностической визуализации *in vitro* или *in vivo* клетки или популяции клеток, экспрессирующих рецептор фолата, или для применения во время мониторинга злокачественного новообразования или воспалительных и аутоиммунных заболеваний и их лечения



Ia



Ib,

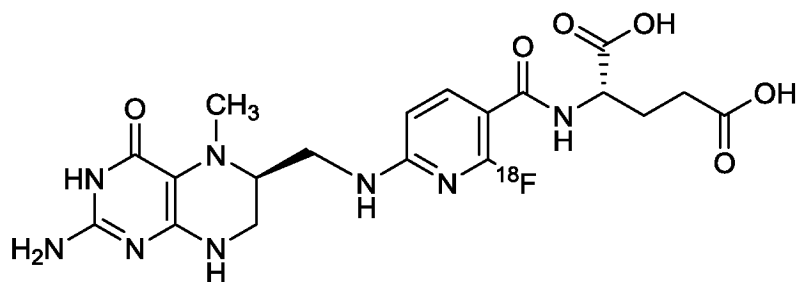
- 5 где
- R_1, R_2 независимо друг от друга представляют собой H или неразветвленный или разветвленный C1-C6 алкил, и
- R_3, R_4 независимо друг от друга представляют собой H, формил, или метил, или его фармацевтически приемлемую соль.
- 10 В предпочтительном варианте осуществления, R_1, R_2 независимо друг от друга представляют собой H или неразветвленный или разветвленный C1-C6 алкил, и R_3 представляет собой метил, и R_4 представляет собой H, или их фармацевтически приемлемую соль.
- 15 В частности, настоящее изобретение относится к соединению, имеющему формулы Ia или Ib, которое предназначено для применения во время диагностической визуализации *in vitro* или *in vivo* клетки или популяции клеток, экспрессирующих рецептор фолата, или для применения во время мониторинга злокачественного новообразования или воспалительных и аутоиммунных заболеваний и их лечения

CN1C(=O)N2C(=O)N(C)CC[C@H]2N1CNc3ccc(NC(=O)C[C@@H](C(=O)OR1)CC(=O)OR2)c[nH]318F

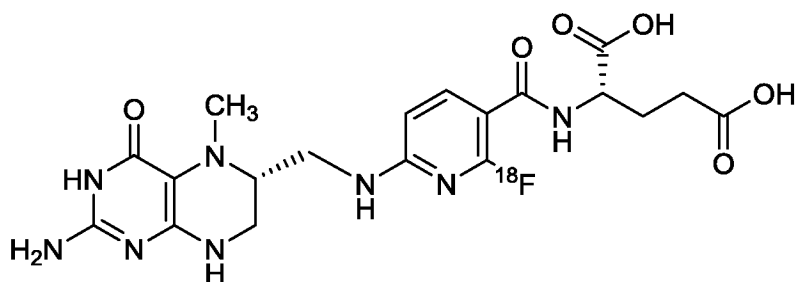
5 где

R₁, R₂ независимо друг от друга представляют собой H, или C1-C12 алкил, или к его фармацевтически приемлемой соли.

В предпочтительном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к соединению, имеющему формулы IIIa или IIIb, предназначенному для применения во время диагностической визуализации *in vitro* или *in vivo* 10 клетки или популяции клеток, экспрессирующих рецептор фолата, или для применения во время мониторинга злокачественного новообразования или воспалительных и аутоиммунных заболеваний и их лечения



IIIa



IIIb,

или к его фармацевтически приемлемой соли.

В отдельных вариантах осуществления изомерно чистое ^{18}F -меченое (6S)- или (6R)-тетрагидрофолатное радиофармацевтическое средство, где фенильная группа в структуре фолата была заменена ^{18}F -меченым N-гетероциклом, относится к солям щелочных или щелочноземельных металлов, предпочтительно к натриевой, калиевой, магниевой или кальциевой солям.

В дополнительном аспекте, настоящее изобретение относится к применению изомерно чистых ^{18}F -меченых (6S)- или (6R)-тетрагидрофолатных радиофармацевтических средств, где фенильная группа в структуре фолата была заменена ^{18}F -меченым N-гетероциклом, (или к их фармацевтическим композициям) во время диагностики или лечения, предпочтительно злокачественного новообразования или воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

В отдельных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению изомерно чистых ^{18}F -меченых (6S)- или (6R)-тетрагидрофолатных радиофармацевтических средств, где фенильная группа в структуре фолата была заменена ^{18}F -меченым N-гетероциклом, (или к их фармацевтическим композициям) во время мониторинга лечения у субъекта злокачественного новообразования или воспалительного и аутоиммунного заболевания, содержащему стадии (I) введения субъекту, нуждающемуся в этом, изомерно чистых ^{18}F -меченых (6S)- или (6R)-тетрагидрофолатных радиофармацевтических средств, где фенильная группа в структуре фолата была заменена ^{18}F -меченым N-гетероциклом, в диагностически визуализируемом количестве, в сочетании с терапевтически активным количеством, и (II) проведения диагностической визуализации с использованием метода ПЭТ посредством обнаружения сигнала от указанного по меньшей мере одного соединения для отслеживания курса

лечения злокачественного новообразования или воспалительного и аутоиммунного заболевания.

В еще одном дополнительном аспекте, настоящее изобретение относится к применению изомерно чистых ^{18}F -меченых (6S)- или (6R)-тетрагидрофолатных радиофармацевтических средств, где фенильная группа в структуре фолата была
 5 заменена ^{18}F -меченым N-гетероциклом, (или к их фармацевтическим композициям) во время диагностической визуализации клетки или популяции клеток, экспрессирующих рецептор фолата.

10 **Фигуры**

Фигура 1: Хроматограммы хиральной ВЭЖХ предшественника, сложного ди-*трет*-бутилового эфира N^2 -ацетил-3'-аза-2'-хлор-5-метилтетрагидрофолата форм 6S-2 и 6R-2 (А) и эталонного сложного ди-*трет*-бутилового эфира N^2 -ацетил-3'-аза-2'-фтор-5-метилтетрагидрофолата форм 6S-2 и 6R-2 с защитной
 15 группой (Б).

Фигура 2: Спектры КД 6S- и 6R-5-МТГФ (А) и 6R-1 и 6S-1 (Б) в диапазоне от 400 нм до 200 нм.

Фигура 3: Наложение спектров КД 6S-5-МТГФ и 6S-3'-аза-2'-фтор-5-МТГФ (А) и 6R-5-МТГФ и 6R-3'-аза-2'-фтор-5-МТГФ (Б).

20 Фигура 4: Хроматограммы СВЭЖХ с радиометрическим детектированием эталонного радиоактивного индикатора 6S/6R- ^{18}F 1 (А), образца печени (Б), плазмы крови (В) и образца мочи (Г) через 60 мин после инъекции 6S/6R- ^{18}F 1. Время удерживания указано поверх пика.

25 Фигура 5: Накопление радиоактивности 6R-3'-аза-2'- ^{18}F фтор-5-МТГФ (А) и 6S-3'-аза-2'- ^{18}F фтор-5-МТГФ (Б) в некоторых выбранных тканях через 30, 60 и 90 мин п.и. (*после инъекции*).

Фигура 6: Сравнение соотношений опухоль-почка (А), опухоль-кровь (Б) и опухоль-печень (В) для 6R- ^{18}F 1 и 6S- ^{18}F 1.

30 Фигура 7: Профиль распределения в тканях ^{18}F -6R-5Me-AzaTHF через 30, 60 и через 90 мин после инъекции.

Фигура 8: Профиль распределения в тканях ^{18}F -6S-5Me-AzaTHF через 30, 60 и через 90 мин после инъекции.

Фигура 9: Сравнение профиля распределения в тканях ^{18}F -6R-5Me-AzaTHF (6R-форма) и ^{18}F -6S-5Me-AzaTHF (6S-форма).

Фигура 10: Сравнение соотношений опухоль-кровь для ^{18}F -6R-5Me-AzaTHF (6R-форма) и для ^{18}F -6S-5Me-AzaTHF (6S-форма).

Фигура 11: Сравнение соотношений опухоль-печень для ^{18}F -6R-5Me-AzaTHF (6R-форма) и для ^{18}F -6S-5Me-AzaTHF (6S-форма).

5 Фигура 12: Сравнение соотношений опухоль-почка для ^{18}F -6R-5Me-AzaTHF (6R-форма) и для ^{18}F -6S-5Me-AzaTHF (6S-форма).

Фигура 13: Сканограммы ПЭТ/КТ КВ-опухоленесущей мыши через 1 ч, 2 ч и 3 ч после инъекции ^{18}F -6R-Aza-5MeTHF. (Tu = опухолевые ксенотрансплантаты, Li = печень, Ki = почка, белая стрелка = желчный пузырь).

10 Фигура 14: Сканограммы ПЭТ/КТ КВ-опухоленесущей мыши через 1 ч, 2 ч и 3 ч после инъекции ^{18}F -6R-Aza-5MeTHF. (Tu = опухолевые ксенотрансплантаты, Li = печень, Ki = почка, белая стрелка = желчный пузырь).

Фигура 15: Сканограммы ПЭТ/КТ КВ-опухоленесущей мыши через 1 ч, 2 ч и 3 ч после инъекции избытка фолиевой кислоты до введения ^{18}F -6R-Aza-5MeTHF. (Li = печень, белая стрелка = желчный пузырь).

Фигура 16: Сканограммы ПЭТ/КТ КВ-опухоленесущей мыши через 1 ч, 2 ч и 3 ч после инъекции ^{18}F -6S-Aza-5MeTHF. (Tu = опухолевые ксенотрансплантаты, Ki = почка, SG = слюнные железы, белая стрелка = желчный пузырь, зеленая стрелка = хориоидное сплетение).

20 Фигура 17: Сканограммы ПЭТ/КТ КВ-опухоленесущей мыши через 1 ч, 2 ч и 3 ч после инъекции ^{18}F -6S-Aza-5MeTHF. (Tu = опухолевые ксенотрансплантаты, Ki = почка, SG = слюнные железы, белая стрелка = желчный пузырь, зеленая стрелка = хориоидное сплетение).

Фигура 18: Сканограммы ПЭТ/КТ КВ-опухоленесущей мыши через 1 ч, 2 ч и 3 ч после инъекции избытка фолиевой кислоты до введения ^{18}F -6S-Aza-5MeTHF. (Bl = мочевого пузырь, белая стрелка = желчный пузырь).

Фигура 19: Сканограммы ПЭТ/КТ опухоленесущей мыши с IGROV-1 (клеточная линия карциномы яичников человека) через 1 ч после инъекции ^{18}F -AzaFol, ^{18}F -5Me-6S-Aza-THF и ^{18}F -5Me-6R-Aza-THF (Tu = опухолевые ксенотрансплантаты, Ki = почка, SG = слюнные железы, белая стрелка = желчный пузырь, зеленая стрелка = хориоидное сплетение).

Фигура 20: Сканограммы ПЭТ/КТ опухоленесущей мыши с IGROV-1 (клеточная линия карциномы яичников человека) через 2 ч после инъекции ^{18}F -AzaFol, ^{18}F -5Me-6S-Aza-THF и ^{18}F -5Me-6R-Aza-THF (Tu = опухолевые

ксенотрансплантаты, Ki = почка, SG = слюнные железы, белая стрелка = желчный пузырь, зеленая стрелка = хориоидное сплетение).

Фигура 21: Сканограммы ПЭТ/КТ опухоленесущей мыши с IGROV-1 (клеточная линия карциномы яичников человека) через 3 ч после инъекции ^{18}F -AzaFol, ^{18}F -5Me-6S-Aza-THF и ^{18}F -5Me-6R-Aza-THF (Tu = опухолевые ксенотрансплантаты, Ki = почка, SG = слюнные железы, белая стрелка = желчный пузырь, зеленая стрелка = хориоидное сплетение).

Фигура 22: Накопление и интернализация $6R$ -[^{18}F]1 (А) или $6S$ -[^{18}F]1 (Б) с использованием FR-положительных КВ-клеток, инкубируемых при температуре 37°C на протяжении 1, 2, или 3 ч. Прекращение исследований осуществляли посредством применения избытка фолиевой кислоты.

Фигура 23: Суммарное накопление и интернализация ^{18}F -AzaFol, с использованием клеточных линий RT16 (FR- α) и D4 (FR- β).

Фигура 24: Суммарное накопление и интернализация $6R$ -3-аза-2- ^{18}F -5-МТГФ с использованием клеточных линий RT16 (FR- α) и D4 (FR- β).

Фигура 25: Суммарное накопление и интернализация $6S$ -3-аза-2- ^{18}F -5-МТГФ с использованием клеточных линий RT16 (FR- α) и D4 (FR- β).

Фигура 26: Структура и стереохимическое обозначение восстановленных ^{18}F -фолатов и нефторированных изомеров.

Подробное описание

В первом аспекте настоящее изобретение относится к применению изомерно чистых ^{18}F -меченых тетрагидрофолатных радиофармацевтических средств, где фенильная группа в структуре фолата была заменена ^{18}F -меченым N-гетероциклом, во время диагностической визуализации *in vitro* или *in vivo* клетки или популяции клеток, экспрессирующих рецептор фолата, или к применению во время мониторинга злокачественного новообразования или воспалительных и аутоиммунных заболеваний и их лечения.

Термин “тетрагидрофолат” или “тетрагидрофолаты”, как его используют в этой заявке, включает соединения на основе структуры 5,6,7,8-тетрагидрофолиевой кислоты. Тетрагидрофолаты (сокращенно ТГФ) в виде 5-метил-ТГФ отличаются от своей окисленной формы, такой как фолиевая кислота, дополнительным хиральным центром в положении C6, что приводит к изомерным (6S)- и (6R)-формам. При этом α -углерод фрагмента глутаминовой

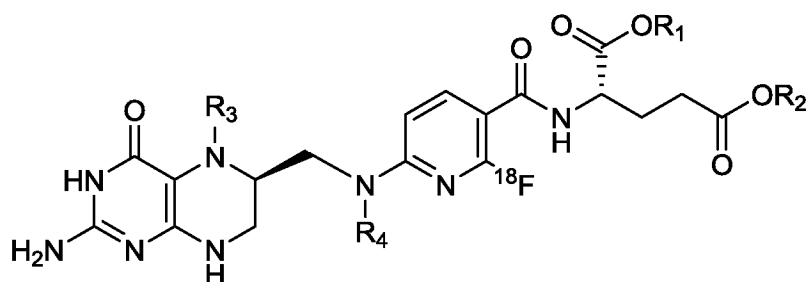
кислоты находится как в фолиевой кислоте, так и в тетрагидрофолатах, которые определены в этой заявке, в виде встречающейся в природе конфигурации.

Соединения, предназначенные для применения в соответствии с настоящим изобретением, представлены предпочтительно в изомерно чистой форме.

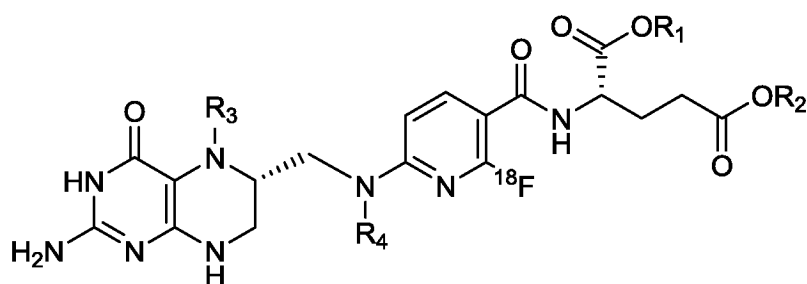
5 Тетрагидрофолаты, как их используют в этой заявке, включают кислотную форму тетрагидрофолата, а также соответствующие сложноэфирные формы.

10 Термины "изомерно чистые", соответствующие термину "стереоизомерно чистые", как их используют в этой заявке, означают соединение в соответствии с изобретением, имеющее изомерный избыток одной формы по отношению к другой форме [(6R)-форма по отношению к (6S)-форме или (6S)-форма по отношению к (6R)-форме], который составляет более приблизительно 80 %, предпочтительно более приблизительно 90 %, предпочтительно более приблизительно 95 %, более предпочтительно более приблизительно 97 %, еще более предпочтительно более приблизительно 99 % или более, и наиболее предпочтительно до 100 %, где остаток может представлять собой один или более других изомеров.

20 В одном особом варианте осуществления, обеспечивают ^{18}F -меченые тетрагидрофолатные радиофармацевтические средства общей формулы Ia или Ib или их фармацевтически приемлемую соль, предназначенные для применения во время диагностической визуализации *in vitro* или *in vivo* клетки или популяции клеток, экспрессирующих рецептор фолата, или для применения во время мониторинга злокачественного новообразования или воспалительных и аутоиммунных заболеваний и их лечения



Ia



Ib,

где R_1 , R_2 независимо друг от друга представляют собой H или неразветвленный или разветвленный C1-C6 алкил, и R_3 , R_4 независимо друг от друга представляют собой H, формил, или метил.

Термин "алкил", когда его используют отдельно или в комбинации, относится к неразветвленным или разветвленным алкильным группам, которые при этом включают в виде индекса количество C-атомов, которое обычно составляет от 1 до 6, предпочтительно от 1 до 4 атомов углерода, таким как метил, этил, пропил, изопропил, бутил, втор-бутил, изобутил, *трет*-бутил и подобные.

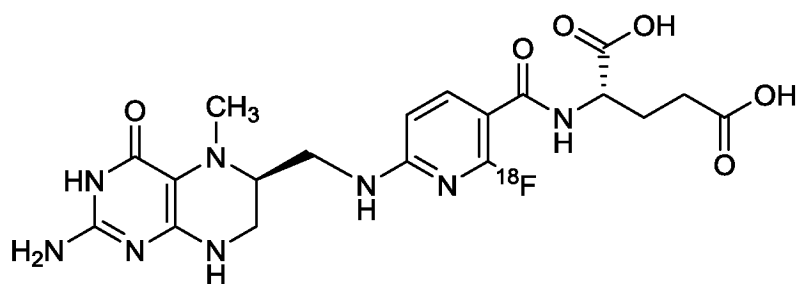
Фармацевтически приемлемые соли могут представлять собой соли щелочных или щелочноземельных металлов, предпочтительно натриевые, калиевые, магниевые или кальциевые соли, или также могут представлять собой кислые соли, такие как соли серной кислоты или соли сульфоновой кислоты, предпочтительно соли серной кислоты.

Соответственно, в отдельных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к соединениям формулы IIa или IIb или к их фармацевтически приемлемой соли, предназначенным для применения во время диагностической визуализации *in vitro* или *in vivo* клетки или популяции клеток, экспрессирующих рецептор фолата, или для применения во время мониторинга злокачественного новообразования или воспалительных и аутоиммунных заболеваний и их лечения,

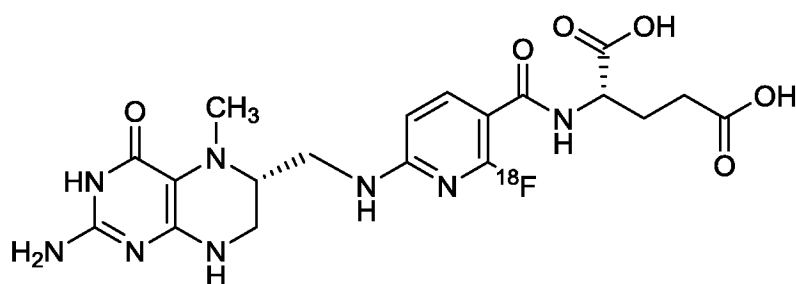
CN1C(=O)N2C(=O)N(C)CC[C@H]2N1CNc3ccc(NC(=O)C[C@@H](C(=O)OR1)CC(=O)OR2)c[nH]318F

5 где R₁, R₂ независимо друг от друга представляют собой Н, или С1-С12 алкил.

10 *vitro* или *in vivo* клетки или популяции клеток, экспрессирующих рецептор фолата, или для применения во время мониторинга злокачественного новообразования или воспалительных и аутоиммунных заболеваний и их лечения



15



IIIb

При этом было обнаружено, что изомерно чистые ^{18}F -меченые тетрагидрофолатные радиофармацевтические средства, где фенильная группа в структуре фолата была заменена ^{18}F -меченым N-гетероциклом, неожиданно демонстрируют сопоставимое сродство к связыванию с FR.

Еще более неожиданно, было выявлено, что изомерно чистые ^{18}F -меченые тетрагидрофолатные радиофармацевтические средства, где фенильная группа в структуре фолата была заменена ^{18}F -меченым N-гетероциклом, показывают разное биораспределение. Это является очень неожиданным, поскольку данные *in vitro* показали подобное FR-сродство в отношении обоих изомеров.

Изомерно чистые ^{18}F -меченые тетрагидрофолатные радиофармацевтические средства, где фенильная группа в структуре фолата была заменена ^{18}F -меченым N-гетероциклом, превзошли соответствующее окисленное производное на основе фолиевой кислоты с точки зрения накопления в опухоли, биораспределения и стабильности *in vivo*.

В целом, изомерно чистые ^{18}F -меченые тетрагидрофолатные радиофармацевтические средства, где фенильная группа в структуре фолата была заменена ^{18}F -меченым N-гетероциклом, очень специфически накапливаются в FR-положительной ткани. По сути, такое накопление не должно ожидаться, поскольку ^{18}F -меченые тетрагидрофолатные радиофармацевтические средства фактически переносятся в ткань с помощью систем-носителей. В частности, в этом отношении (6S)-форма демонстрирует поведение, подобное поведению окисленной формы.

При этом раскрытое заметно улучшенное соотношение опухоли к почке, в частности, в отношении (6R)-формы ^{18}F -меченых тетрагидрофолатных радиофармацевтических средств, где фенильная группа в структуре фолата была заменена ^{18}F -меченым N-гетероциклом, является очень неожиданным и не должно было ожидаться.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способу диагностической визуализации клетки или популяции клеток, экспрессирующих рецептор фолата, при этом указанный способ содержит стадии введения по меньшей мере одного соединения в соответствии с формулой Ia, Ib, IIa, IIb, IIIa, или IIIb, в диагностически визуализируемом количестве, и получения диагностического изображения указанной клетки или популяции клеток.

В еще одном дополнительном аспекте, настоящее изобретение обеспечивает применения изомерно чистых ^{18}F -меченых тетрагидрофолатных радиофармацевтических средств для удобного и эффективного введения субъекту, нуждающемуся в диагностической визуализации.

Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает способ диагностической визуализации клетки или популяции клеток, экспрессирующих рецептор фолата, при этом указанный способ содержит стадии введения по меньшей мере одного изомерно чистого ^{18}F -меченого тетрагидрофолатного радиофармацевтического средства в соответствии с изобретением, в диагностически визуализируемом количестве, и получения диагностического изображения указанной клетки или популяции клеток.

Указанная визуализация может осуществляться *in vitro* или *ex vivo* (биопсия), или *in vivo* в отношении клетки или популяции клеток, экспрессирующих рецептор фолата. Типичные клетки или популяции клеток, сверхэкспрессирующих рецептор фолата- α , представляют собой типы эпителиального рака, такого как рак яичников, матки, почки, молочной железы, легкого и рак ободочной и прямой кишки.

Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает способ *in vitro* обнаружения клетки, экспрессирующей рецептор фолата, в образце ткани, который включает приведение в контакт указанного образца ткани по меньшей мере с одним изомерно чистым ^{18}F -меченым тетрагидрофолатным радиофармацевтическим средством в соответствии с изобретением, в эффективном количестве и на протяжении достаточного периода времени и достаточных условий, для того чтобы произошло связывание, и обнаружения такого связывания посредством ПЭТ визуализации.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение обеспечивает применения изомерно чистых ^{18}F -меченых тетрагидрофолатных радиофармацевтических средств в соответствии с настоящим изобретением для

удобного и эффективного введения субъекту, нуждающемуся в диагностической визуализации или мониторинге лечения злокачественного новообразования или воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ
5 одновременной диагностики и лечения, содержащий стадии введения субъекту, нуждающемуся в этом, по меньшей мере одного изомерно чистого ^{18}F -меченого тетрагидрофолатного радиофармацевтического средства в соответствии с настоящим изобретением в эффективном количестве, необходимом для
10 диагностики, в сочетании с терапевтически активным количеством, и получения диагностического изображения указанных тканей для отслеживания курса лечения.

Субъект в соответствии со способами настоящего изобретения предпочтительно представляет собой млекопитающее, такое как животное или человек, предпочтительно человек.

15 Доза зависит от природы желаемого действия, например, от вида диагностики или лечения, от вида и регулярности лечения, от диагностической аппаратуры, от способа применения препарата, а также от возраста, массы тела, питания и состояния, вида сопутствующего лечения, если таковое имеется.

Однако, понятно, что наиболее предпочтительная доза может подбираться к
20 потребностям конкретного субъекта, и может определяться специалистом в данной области, без проведения излишних экспериментов. Обычно это включает корректирование стандартной дозы, например, уменьшение дозы, если пациент имеет низкую массу тела.

Лечение может начинаться с меньшего количества, ниже оптимального
25 количества, которое далее может повышаться для достижения оптимального воздействия. Процедура визуализации в ПЭТ-сканере осуществляется на протяжении времени, находящегося в диапазоне от минут до 2 - 4 часов после введения радиоактивного индикатора. Режим зависит от цели визуализации и кинетики радиоактивного индикатора, а также от желаемой информации.

30 Предпочтительным путем введения изомерно чистых ^{18}F -меченых тетрагидрофолатных радиофармацевтических средств в соответствии с настоящим изобретением является парентеральное введение, например, посредством внутривенной инъекции.

Подходящие формы для инъекции включают стерильные водные растворы или дисперсии упомянутых выше изомерно чистых ^{18}F -меченых тетрагидрофолатных радиофармацевтических средств в соответствии с настоящим изобретением. Как правило, радиофармацевтическое средство

5 составляют в виде смеси в физиологических буферных растворах.

Изомерно чистые ^{18}F -меченые тетрагидрофолатные радиофармацевтические средства подвергают стерилизации с помощью любого признанного в уровне техники метода, включая, но при этом не ограничиваясь этим, добавление антибактериальных или противогрибковых средств, например, парабена,

10 хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала, и подобных. Предпочтительно, их подвергают стерильной фильтрации перед введением, при этом устраняется необходимость в дополнительных стерилизующих средствах.

Для раствора, подлежащего введению посредством инъекции, предпочтительная единичная доза составляет от приблизительно 0,01 мл до

15 приблизительно 10 мл. После парентерального введения, может осуществляться визуализация органа или опухоли *in vivo*, если это является желательным, на протяжении времени в диапазоне от минут до 2 - 4 часов после того как меченый радиоактивным изотопом реагент вводили субъекту, предоставляя возможность накопления достаточного количества введенной дозы в выбранной целевой

20 области.

Изомерно чистые ^{18}F -меченые тетрагидрофолатные радиофармацевтические средства в соответствии с изобретением также могут применяться для *in vitro* обнаружения клетки, экспрессирующей рецептор фолата, в биопсии ткани, взятой у субъекта. Таким образом, в дополнительном варианте осуществления

25 настоящее изобретение обеспечивает способ *in vitro* обнаружения клетки, экспрессирующей рецептор фолата, например, опухолевой клетки, в образце ткани, при этом указанный способ включает приведение в контакт указанного образца ткани с изомерно чистыми ^{18}F -мечеными тетрагидрофолатными радиофармацевтическими средствами в соответствии с настоящим

30 изобретением, в эффективном количестве и на протяжении достаточного периода времени и достаточных условий, для того чтобы произошло связывание, и обнаружение такого связывания посредством методов визуализации.

Образцы можно собирать посредством процедур, известных специалисту в данной области, например, путем отбора биопсии ткани или биологической

жидкости организма, путем аспирации для трахеальных или легочных образцов, и подобного.

Образцы ткани, которые подвергают исследованию, включают любую ткань, в которой предполагают наличие клетки, экспрессирующей рецептор фолата, такой как опухолевые клетки, эпителиальные клетки, клетки почек, 5 желудочно-кишечного тракта или гепатобилиарной системы, и другие клетки. Из образцов могут быть приготовлены срезы, например, с помощью микротомы, с тем, чтобы облегчить микроскопическое исследование и наблюдение. Образцы также могут быть фиксированы с помощью подходящего фиксатора, либо до, 10 либо после инкубация с одним из ^{18}F -меченых тетрагидрофолатных радиофармацевтических средств в соответствии с настоящим изобретением для улучшения гистологического качества образцов ткани.

Время и условия, достаточные для связывания изомерно чистых ^{18}F -меченых тетрагидрофолатных радиофармацевтических средств в соответствии с 15 настоящим изобретением с рецептором фолата на клетке, включают стандартные условия культивирования тканей, т.е. образцы можно культивировать *in vitro* и инкубировать с одним из комплексов или композиций в соответствии с настоящим изобретением в физиологической среде. Такие условия хорошо известны специалисту в данной области. В качестве альтернативы, образцы 20 можно фиксировать, а затем инкубировать с изомерно чистыми ^{18}F -мечеными тетрагидрофолатными радиофармацевтическими средствами в соответствии с настоящим изобретением в изотоническом или физиологическом буфере.

Для всех применений подходящим является получать изомерно чистые ^{18}F -меченые тетрагидрофолатные радиофармацевтические средства в соответствии с 25 настоящим изобретением на месте, или поблизости от места, где они должны применяться.

Все соединения и/или способы, раскрытые и заявленные в этой заявке, можно получать и осуществлять без проведения излишних экспериментов с учетом настоящего раскрытия. Для специалистов в данной области является 30 очевидным, что в настоящем изобретении могут быть осуществлены модификации, не выходя за рамки объема изобретения. Примеры, представленные в этой заявке, предназначены для иллюстрации, и не являются исчерпывающими; соответственно, проиллюстрированные Примеры не должны рассматриваться как ограничивающие изобретение каким-либо образом.

Примеры

Материалы и методы

5

Общие сведения:

Реагенты и растворители были приобретены у компании Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Acros Organics, и их использовали без очистки. Структурные звенья были приобретены у компаний ABCR-Chemicals, Apollo Scientific, Fluka-Chemie и Merck & Cie (Шаффхаузен, Швейцария). 6*R*-10-формил-5-метилтетрагидроптероиновая кислота (6*R*-10-формил-5-МТНР) была предоставлена компанией Merck & Cie (Шаффхаузен, Швейцария). Контроль качества указанных структурных звеньев осуществляли с использованием ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР, cosygr и ВР-МС.

15 Растворители для проведения флэш-хроматографии, перемещения реакционных смесей, проведения процедур экстракции и промывания были приобретены непосредственно на складе топлива ЕТН (*ЕТН: Швейцарская высшая техническая школа*).

20 *Аналитические методы:*

Спектры ядерного магнитного резонанса записывали на спектрометре Bruker с рабочей частотой 400 или 500 МГц с соответствующими сигналами растворителя в качестве внутреннего эталона. Химические сдвиги указаны в миллионных долях (м.д.) относительно тетраметилсилана (0,00 м.д.). Значения константы сочетания (*J*) представлены в герцах (Гц); в указанном разделе для описания ¹H ЯМР используют следующие сокращения: синглет (s), дублет (d), триплет (t), квартет (q), мультиплет (m), дублет дублетов (dd), дублет дублетов (ddd) и широкий сигнал (bs). Химические сдвиги мультиплетов комплексов представлены в виде интервала их проявлений.

30 Масс-спектры с высокой разрешающей способностью (ВР-МС (*англ.: HR-MS*)) записывали МС-службой лаборатории органической химии в Швейцарской высшей технической школе Цюриха (*Laboratorium für Organische Chemie at ETH Zürich*) на Varian IonSpec Ultima MALDI-FT-ICR или Bruker Daltonics Ultra-Flex II MALDI-TOF. Транс-2-[3-(4-трет-бутилфенил)-2-метил-2-пропенил-

иден]малононитрил (DCTB) и 3-гидроксипиридин-2-карбоновая кислота (3-НРА) служили в качестве матриц для МАЛДИ (*англ.: MALDI*) масс-спектрометрии (масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией). Масс-спектры ESI (*с электрораспылительной ионизацией*) записывали с использованием Bruker FTMS 4.7 T BioAPEXII (ESI).

5 Препаративную ВЭЖХ осуществляли с использованием системы Merck-Hitachi, оснащенной интерфейсом D7000, детектором L-7400 UV, и насосом L-7150, используя колонку Ultimate XB-C18 (150 x 21,2 мм, 5 мкм) (Ultisil, компания Welch Materials) с линейной скоростью потока, составляющей
10 15 мл/мин (280 нм).

Аналитическую ВЭЖХ осуществляли с использованием системы Merck-Hitachi, оснащенной интерфейсом D-7000, детектором L-7400 UV, и насосом L-7100, с использованием колонки sunFire C18 (4,6 x 150 мм, 5 мкм). Если не
15 указано иное, контроль реакции осуществляли с помощью аналитической ВЭЖХ с использованием 10 мМ раствора NH_4HCO_3 (растворитель А) и MeCN (растворитель Б) и следующего градиента: 0-30 мин: 100 – 60 % А, 30-35 мин: 60 % А, 35-36 мин: 60 – 100 % А, 36-40 мин: 100 % А с линейной скоростью потока, составляющей 1 мл/мин, и с длиной волны 280 нм.

20 Полупрепаративную ВЭЖХ осуществляли с использованием системы Merck-Hitachi, оснащенной интерфейсом D-7000, детектором L-7400 UV, и насосом L-7100, с колонкой sunFire C18 (10 x 150 мм, 5 мкм), используя 10 мМ буфера NH_4HCO_3 (растворитель А) и MeCN (растворитель Б) в качестве системы растворителей с линейной скоростью потока, составляющей 4 мл/мин, с длиной волны 280 нм.

25 Аналитическую ВЭЖХ с радиометрическим детектированием осуществляли на системе Agilent 1100 series HPLC, оснащенной 100 мкл-loop и радиометрическим детектором GabiStar (компания Raytest). Использовали аналитическую колонку Phenomenex Gemini C18 (4,6 x 250 мм, 5 мкм, 110 Å, без предколонки) с линейной скоростью потока 1 мл/мин с длиной волны 280 нм.
30 Аналитическую ВЭЖХ осуществляли с использованием 10 мМ NH_4HCO_3 (растворитель А) и MeCN (растворитель Б) в качестве системы растворителей и следующего градиента: 0-20 мин: 95 – 60 % А, 20-25 мин: 60 % А, 25-26 мин: 60-95 % А, 26-30 мин: 95 % А.

Контроль реакции осуществляли, применяя сверхвысокоэффективную жидкостную хроматографии с радиометрическим детектированием (СВЭЖХ с радиометрическим детектированием, компания Waters), с использованием колонки Acquity UPLC BEH C18 (2,1 x 50 мм, 1,7 мкм, компания Waters) и
 5 присоединенного детектора совпадений (FlowStar LB513, компания Berthold) и 10 mM раствора NH_4HCO_3 (растворитель А) и MeCN (растворитель Б) в качестве системы растворителей со следующим градиентом: 0-0,3 мин 90 % А, 0,3-3,0 мин 90 % – 50 % А, 3,0-3,1 мин: 50 - 20 % А, 3,1-3,5 мин: 20 % А, 3,5-3,6 мин: 20-90 % А, 3,6-4,0 мин: 90 % А с линейной скоростью потока, составляющей 0,6
 10 мл/мин, и с длиной волны 280 нм.

Радиохимия: Получение высушенного [^{18}F]Фторида:

[^{18}F]фторид без добавления носителя получали посредством облучения жидкостной мишени, наполненной изотопно-обогащенной [^{18}O]H₂O (930 мкл,
 15 97%, Cambridge Isotope Laboratories), протонным пучком 18 МэВ на циклотроне 18/9 (компания IBA, Бельгия). Радиоактивное излучение (36 - 45 ГБк) передавали в горячую камеру синтеза с помощью непрерывного потока гелия. Водный раствор [^{18}F]фторида улавливали на картридж Sep-Pak Light Accell Plus carb QMA (компания Waters) без предварительной обработки. Элюирование
 20 осуществляли посредством применения раствора либо K_2CO_3 (1,2 мг, 8,7 мкмоль) и Kryptofix (10 мг, 26,6 мкмоль), либо Cs_2CO_3 (2,8 мг, 8,6 мкмоль) и Kryptofix (5 мг, 13,3 мкмоль), в смеси H₂O (0,6 мл) и MeCN (1,4 мл). Элюат собирали в герметичный химический реактор (5 мл) компании Wheaton, и растворитель упаривали при температуре 95 °С в условиях пониженного
 25 давления и слабого потока азота на протяжении 10 мин. После этого, трижды добавляли MeCN (1 мл) и упаривали до сухого состояния на протяжении 3 мин при температуре 95 °С. И в конце, на протяжении 5 мин при температуре 95 °С применяли полный вакуум без потока азота.

30 *Исследования биораспределения:*

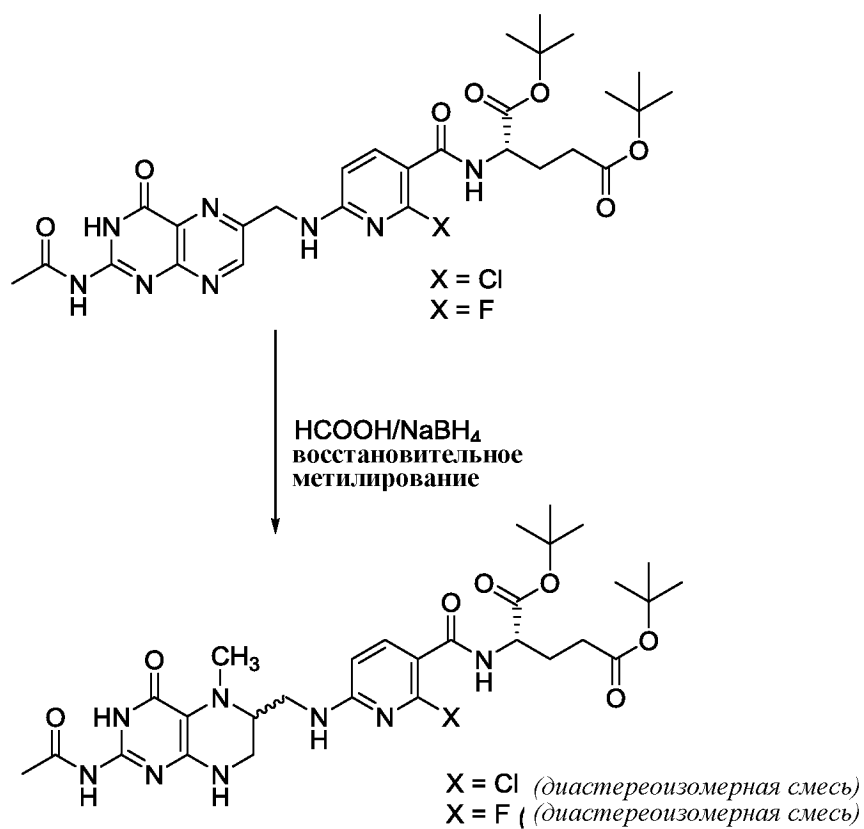
Исследования биораспределения осуществляли через 2 недели после инокуляции клеток. ^{18}F -фолатные радиоактивные индикаторы (~5 МБк/мышь) вводили в объеме 100 мкл посредством инъекции в латеральную хвостовую вену. Животных умертвляли через 30 мин, 60 мин и 90 мин после введения

радиоактивных индикаторов. Собирали выбранные ткани и органы, взвешивали, и измеряли радиоактивность с использованием γ -счетчика. Результаты были представлены в виде процентов введенной радиоактивности на грамм массы ткани (% ВР/г), используя число отсчетов заданного объема исходного раствора для инъекций, измеряемые в то же время, в результате чего получали скорректированные значения с учетом распада.

Визуализирующие методы исследования ПЭТ/КТ:

Мышей подготавливали тем же способом, что и в случае исследования биораспределения. Для получения ПЭТ/КТ-сканогамм мышей использовали настольный доклинический ПЭТ-сканер (Genisys⁸, Sofie Biosciences, США, и Perkin Elmer, США). Канал регистрации излучения устанавливали на 150 - 650 кэВ. С помощью внутривенной инъекции мышам вводили ¹⁸F-радиоактивные индикаторы (~5 МБк в 100 мкл). Во время сканирований, которые продолжались на протяжении 10 мин, мышей анестезировали посредством применения смеси изофлурана и кислорода. Сканирования осуществляли через 1 ч, 2 ч и 3 ч после инъекции ¹⁸F-радиоактивных индикаторов, используя программное обеспечение G8 acquisition (версия 2.0.0.10). Изображения были воспроизведены с максимизацией ожидания максимального правдоподобия (MLEM). Для надлежащего представления изображений ПЭТ/КТ, регулировали масштаб изображений, что позволяло обеспечить оптимальную визуализацию опухолевой ткани и почек. (Прибл. 10 % на нижней шкале отрезали).

Пример 1: Синтез и разделение (с помощью хиральной ВЭЖХ) 6*S*- и 6*R*-сложного ди-*tert*-бутилового эфира *N*²-ацетил-3'-аза-2'-фтор/2'-хлор-5-метилтетрагидрофолатата



5

Схема 1а

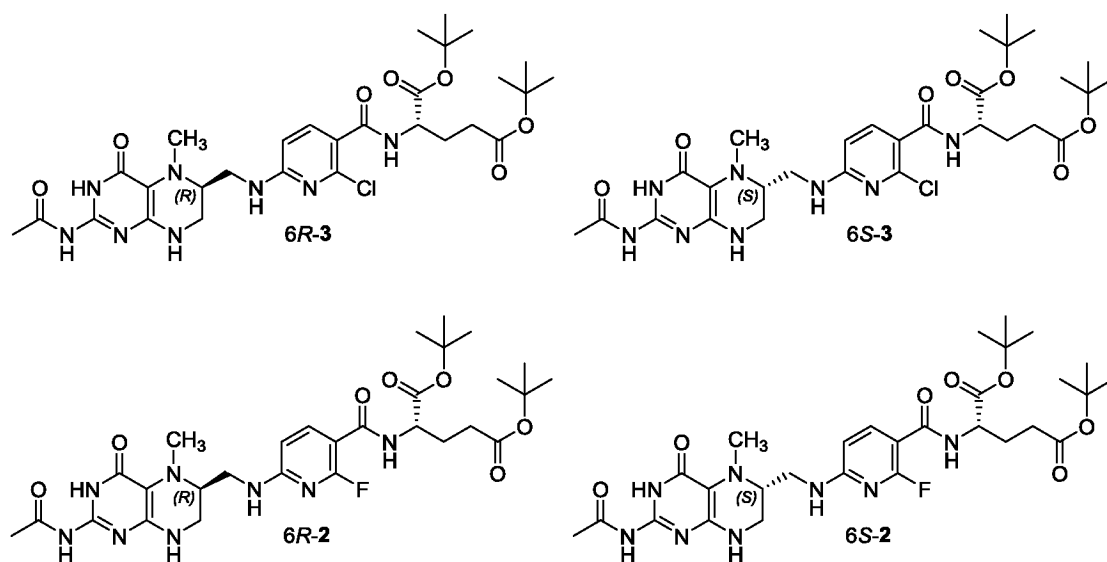
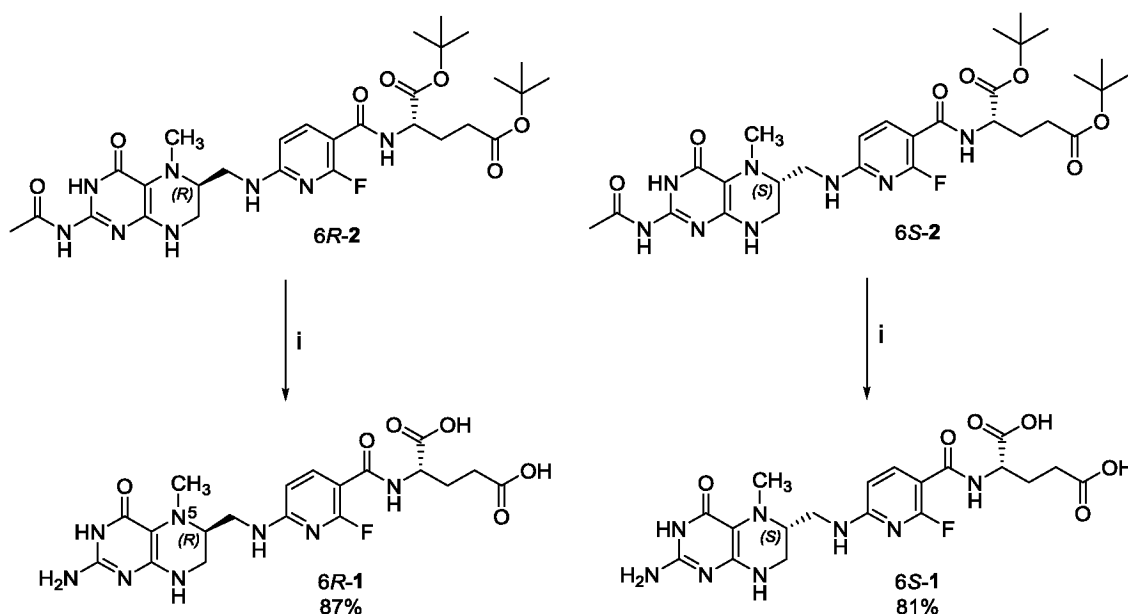


Схема 1б

Синтез 1:1 диастереомерных смесей 6*S*- и 6*R*- сложного ди-*трет*-бутилового эфира *N*²-ацетил-3'-аза-2'-хлор-5-МТГФ и 6*S*- и 6*R*- сложного ди-*трет*-бутилового эфира *N*²-ацетил-3'-аза-2'-фтор-5-МТГФ осуществляли посредством восстановительного метилирования сложного ди-*трет*-бутилового эфира *N*²-ацетил-3'-аза-2'-хлор-фолиевой кислоты и сложного ди-*трет*-бутилового эфира *N*²-ацетил-3'-аза-2'-фтор-фолиевой кислоты (Схема 1а) по аналогии с общим методом, описанным в литературе ("Reactions of Sodium Borohydride in Acidic Media. I. Reduction of Indoles and Alkylation of Aromatic Amines with Carboxylic Acids", G.W. Gribble, P. D. Lord, J. Skotnicki, S. E. Dietz, J.T. Eaton, J. L. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* 1974, 96, стр. 7812), посредством применения метил-*трет*-бутилового эфира и тетрагидрофурана в качестве растворителей. Продукты исследовали с помощью ЖХ-МС, ¹H-ЯМР и ВЭЖХ. Синтез сложного ди-*трет*-бутилового эфира *N*²-ацетил-3'-аза-2'-хлор-фолиевой кислоты и сложного ди-*трет*-бутилового эфира *N*²-ацетил-3'-аза-2'-фтор-фолиевой кислоты осуществляли в соответствии с WO 2013/167653. Хиральное разделение двух диастереоизомеров обеих смесей на соединения, как раскрыто на Схеме 1б, осуществляли с использованием колонки Reprosil 100 Chiral-NR HPLC, работающей на нормальной фазе (изократическая, гексан/изопропанол 1:1, Фигура 1). 6*R*- сложный ди-*трет*-бутиловый эфир *N*²-ацетил-3'-аза-2'-фтор-5-метилтетрагидрофолата (6*R*-2) относится к диастереоизомеру, который элюируется первым через 14,0 мин, тогда как 6*S*- сложный ди-*трет*-бутиловый эфир *N*²-ацетил-3'-аза-2'-фтор-5-метилтетрагидрофолата (6*S*-2) относится к изомеру, который элюируется вторым через 17,5 мин.

Пример 2: синтез 6*R*-3'-аза-2'-фтор-5-метилтетрагидрофолата

После хирального разделения получали чистые диастереомерные формы 6*R*-2 и 6*S*-2 (Фигура 1), и применяли их в качестве исходных веществ для синтеза 6*R*-1 и 6*S*-1. Удаление защитной группы в кислой среде с 6*R*-2 и 6*S*-2 в ацетоне после очистки приводит к получению 6*R*- и 6*S*-3'-аза-2'-фтор-5-МТГФ форм 6*R*-1 и 6*S*-1 с химическим выходом 81 % и 87 %, соответственно (Схема 1в).



^a(i) 4M HCl, ацетон, 70 °C, 1 ч.

Схема 1в

- 5 **6R-2** (7.00 мг, 11.1 мкмоль) растворяли в ацетоне (200 мкл) и 4M HCl (500 мкл) и перемешивали на протяжении 1 ч при температуре 70 °C (Схема 1б). После завершения реакции, раствор нейтрализовали с использованием 4M NaOH, и продукт очищали посредством полупрепаративной ВЭЖХ. Лиофилизация фракций продукта приводит к получению **6R-γ-1** в виде белого
- 10 твердого вещества с выходом 87 % (4,62 мг) и высокой химической и диастереомерной чистотой, составляющей >95 %.

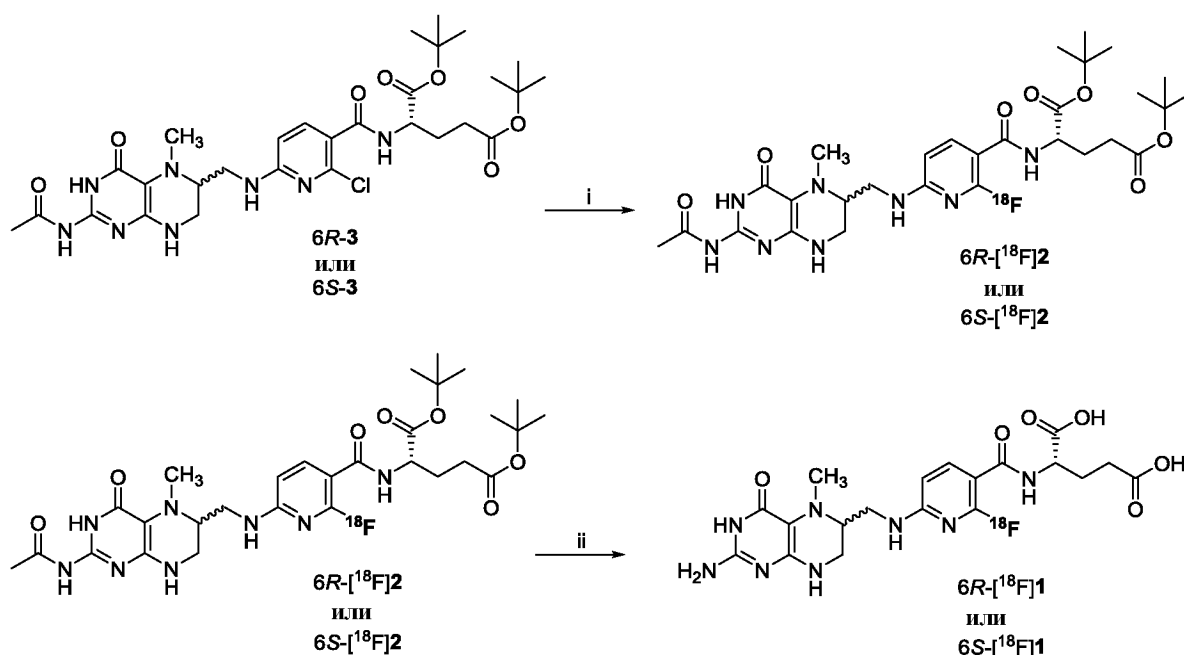
Пример 3: синтез 6S-3'-аза-2'-фтор-5-метилтетрагидрофолата

- 15 **6S-2** (8,00 мг, 12,6 мкмоль) растворяли в ацетоне (200 мкл) и 4M HCl (500 мкл), и перемешивали на протяжении 1 ч при температуре 70 °C (Схема 1б). После завершения реакции, раствор нейтрализовали с использованием 4M NaOH, и продукт очищали посредством полупрепаративной ВЭЖХ. Лиофилизация фракций продукта приводит к получению **6S-γ-1** в виде белого
- 20 твердого вещества с выходом 81 % (4,96 мг) и высокой химической и диастереомерной чистотой, составляющей >95 %.

Пример 4: Определение абсолютной конфигурации двух эталонных диастереоизомеров (6*R*-1 и 6*S*-1) с помощью кругового дихроизма (КД)

Записывали спектры КД 6*S*- и 6*R*-5-МТГФ и двух эталонных соединений 6*R*- и 6*S*-3'-аза-2'-фтор-5-МТГФ (6*R*-1 и 6*S*-1) (Фигуры 2А и 2Б). Для двух
5 соответствующих 6*R*- и 6*S*-диастереоизомеров каждой из двух пар фолатов получали спектры с противоположных сторон. Спектры 6*S*- и 6*R*-5-МТГФ служили в качестве эталонных спектров, поскольку стереохимия указанных двух веществ была известна. В литературе указано, что птерин показывает типичную
10 полосу поглощения приблизительно при 345 нм и вторую полосу при 280 нм. Эти две типичные полосы поглощения также видны на всех четырех записанных спектрах КД. Может быть проведена корреляция эталонных спектров 6*S*- и 6*R*-5-МТГФ со спектрами двух эталонных диастереоизомеров 6*R*- и 6*S*-3'-аза-2'-фтор-5-МТГФ (Фигура 3). Поскольку пики 6*R*-5-МТГФ и 6*R*-3'-аза-2'-фтор-5-МТГФ при 310 нм оба являются негативными, и оба пика при 280 нм являются
15 положительными, можно предположить, что 6*R*-3'-аза-2'-фтор-5-МТГФ является 6*R*-изомером (Фигура 3А), так как указанные поглощения происходят от птерина, имеющего стереоцентр. Такая же корреляция может быть проведена с 6*S*-3'-аза-2'-фтор-5-МТГФ и 6*S*-5-МТГФ (Фигура 3Б), где пики при 310 нм являются положительными и оба пика при 280 нм являются негативными. На
20 основании указанных результатов можно сделать заключение, что 6*S*-3'-аза-2'-фтор-5-МТГФ имеет *S*-конфигурацию в положении 6.

Пример 5: Получение 6*S*- и 6*R*-3'-аза-2'-[¹⁸F]фтор-5-МТГФ (6*S*- и 6*R*-[¹⁸F]1)^a



^a (i) [¹⁸F]CsF-K_{2.2.2}, ДМСО, 160 °С, 10 мин; (ii) 4М НСl, 70 °С, 10 мин.

5

Радиохимические синтезы 6*S*- и 6*R*-3'-аза-2'-[¹⁸F]фтор-5-МТГФ осуществляли по аналогии с радиохимическим синтезом 3'-аза-2'-[¹⁸F]фторфолиевой кислоты, описанным ранее в литературе (Betz et al. (2013) Radiosynthesis and Preclinical Evaluation of 3'-Aza-2'-[¹⁸F]fluorofolic Acid: A Novel PET Radiotracer for Folate Receptor Targeting. *Bioconjug. Chem.* 24, 205-214.) Предшественник 6*R*- или 6*S*- сложный ди-*tert*-бутиловый эфир *N*²-ацетил-3'-аза-2'-хлор-5-МТГФ (6*R*- или 6*S*-2, 2,50 мг, 3,85 мкмоль) растворяли в безводном ДМСО (300 мкл) и добавляли к азеотропно высушенному комплексу [¹⁸F]фторид-криптан (30 - 35 ГБк). Реакционную смесь нагревали при температуре 160 °С на протяжении 10 мин. Затем, раствору давали остыть на протяжении 5 мин, и добавляли H₂O (5 мл). Раствор пропускали через картридж Sep-Pak Plus tC18 (компания Waters, предварительно обработанный 5 мл MeOH, после этого 10 мл H₂O) для улавливания промежуточного продукта 6*R*- или 6*S*-[¹⁸F]2. Непрореагировавший [¹⁸F]фторид удаляли, промывая картридж H₂O (8 мл). Меченый промежуточный продукт 6*R*- или 6*S*-[¹⁸F]2 элюировали посредством пропускания MeCN (2,5 мл) через картридж в другой герметичный химический реактор (5 мл) компании Wheaton. Упаривание MeCN до почти

20

сухого состояния осуществляли в условиях пониженного давления и в потоке азота при температуре 90 °С. Отщепление защитных групп осуществляли посредством добавления к реакционной смеси 4М раствора HCl (1,25 мл) и нагревания на протяжении 10 мин при температуре 70 °С, до получения 6*R*- или 6*S*-[¹⁸F]1. Реакционной смеси давали остыть на протяжении 2 мин и, для стабилизации продукта и для нейтрализации кислого раствора, соответственно, добавляли 10 мМ натрий-фосфатного буфера с рН 7.4, содержащего 50 мг/мл Na-(+)-L-аскорбата (2,5 мл) и 4М NaOH (1,0 мл). Очистку продукта осуществляли с помощью полупрепаративной ВЭЖХ с радиометрическим детектированием.

10 Фракцию продукта собирали и пропускали через стерильный фильтр в стерильный и апиrogenный сосуд. Контроль качества 6*R*- или 6*S*-[¹⁸F]1 осуществляли с помощью аналитической ВЭЖХ с радиометрическим детектированием. В конце синтеза получали 350 - 1600 МБк (р.х. выход 1 - 5 %) конечных радиоактивных индикаторов. Удельная радиоактивность

15 варьировалась от 46 до 250 ГБк/мкмоль, и радиохимическая чистота составляла более 95 %.

Очистку с использованием полупрепаративной ВЭЖХ с радиометрическим детектированием осуществляли посредством применения 0,1 % EtOH в 10 мМ NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (рН 7,4) и 50 мг/мл Na-(+)-L-аскорбата (растворитель А) и 40% EtOH в 10 мМ NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (рН 7,4) и 50 мг/мл Na-(+)-L-аскорбата (растворитель Б) в качестве системы растворителя с градиентом 0 – 15 мин: 100-85 % А, 15 – 40 мин: 85 % А, и линейной скоростью потока, составляющей 4 мл/мин (280 нм). Аналитическую ВЭЖХ с радиометрическим детектированием осуществляли посредством применения 50 мМ NaH₂PO₄ (рН 6,5) (растворитель А) и 30 % MeCN в 50 мМ NaH₂PO₄ (рН 8,0) (растворитель Б) в качестве системы растворителей с градиентом 0 – 14 мин: 100 – 45 % А, 14 - 17 мин: 45 – 0 % А, 17 – 25 мин: 0 % А, 25 – 26 мин: 0 – 100 % А, 26 – 32 мин: 100 % А, и линейной скоростью потока, составляющей 1 мл/мин (280 нм).

30 **Пример 6: Определение коэффициента распределения**

Коэффициент распределения (logD_{7.4}) 6*S*-[¹⁸F]1 и 6*R*-[¹⁸F]1 определяли с использованием метода встряхиваемой колбы, описанного в литературе (Таблица 1) (Boss и др. (2015) Comparative Studies of Three Pairs of α- and γ-Conjugated Folic Acid Derivatives Labeled with Fluorine-18. *Bioconjug. Chem.*

acs.bioconjchem.5b00644; Wilson и др. (2001) An admonition when measuring the lipophilicity of radiotracers using counting techniques. *Appl. Radiat. Isot.* 54, 203–208.) Вкратце, радиоактивный индикатор добавляли к смеси фосфатного буфера (500 мкл, pH 7,4) и *n*-октанола (500 мкл) при комнатной температуре. Образцы
 5 встряхивали на протяжении 15 мин в верхнем сосуде для встряхивания, и центрифугировали на протяжении 3 мин со скоростью 5000 об/мин, чтобы разделить две фазы. Аликвоты (50 мкл) обеих фаз добавляли в пробирки Эппендорфа, и затем анализировали в γ -счетчике (Wizard, компания PerkinElmer). Коэффициент распределения выражают в виде соотношения между
 10 концентрациями радиоактивности (имп/мин/мл) *n*-октанола и фазы фосфатного буфера. Значения представляют собой среднее значение $\pm$ стандартное отклонение шести чисел из двух независимых экспериментов.

Таблица 1: Представление значений $\text{LogD}_{7.4}$ фолатов и птероатов.

Соединение	$\log D_{7.4}$
6 <i>S</i> -[^{18}F]1	$-4,6 \pm 0,1$
6 <i>R</i> -[^{18}F]1	$-4,6 \pm 0,1$

Пример 7: Исследование in vitro

Сродство к связыванию нерадиоактивных эталонных соединений 6*R*-1 и 6*S*-1 определяли с использованием КВ-клеток в анализе вытеснения с [^3H]фолиевой кислотой. Результаты (Таблица 2) показали, что два эталонных
 20 диастереоизомера 6*R*-1 и 6*S*-1 имеют подобное высокое сродство к связыванию с FR- α и подобны значениям 6*S*- и 6*R*-5-МТГФ. Было установлено, что значение ИК₅₀ для фолиевой кислоты в тех же экспериментальных условиях составляло $0,6 \pm 0,1$ нМ, тогда как 3'-аза-2'-[^{18}F]фторфолиевая кислота показала значение ИК₅₀, составляющее $1,4 \pm 0,5$ нМ. По сравнению с окисленной формой,
 25 соответствующие восстановленные аза-фолатные производные, 6*R*-1 и 6*S*-1, показывают приблизительно в 17 раз более низкое сродство к связыванию с FR- α .

Таблица 2: Сравнение *in vitro* данных сродства 6*R*- и 6*S*-3'-аза-2'-фтор-5-МТГФ (6*R*-1 и 6*S*-1) к связыванию с FR-α, по сравнению с 6*R*- и 6*S*-5-МТГФ и фолиевой кислотой. (*n* = 3).

Соединение	ИК ₅₀ [нМ]
Фолиевая кислота	0,6 ± 0,1
6 <i>S</i> -5-МТГФ	20,6 ± 0,4
6 <i>R</i> -5-МТГФ	25,8 ± 5,8
6 <i>S</i> -1	23,8 ± 4,0
6 <i>R</i> -1	27,1 ± 3,7

5 **Пример 8: Накопление и интернализация клетками**

Для того чтобы исследовать FR-специфическое накопление и интернализацию клетками, осуществляли накопление и интернализацию клетками 6*R*-[¹⁸F]1 и 6*S*-[¹⁸F]1, используя FR-положительные КВ-клетки. Накопление клетками постоянно возрастало с течением времени для обоих диастереоизомеров, в результате чего получали накопление, которое составляло приблизительно 60 % (в расчете на 0,3 мг белка) суммарной введенной радиоактивности после 3 ч инкубации при температуре 37 °С (Фигура 22). Было установлено, что интернализация составляет приблизительно 8 % для 6*R*-[¹⁸F]1 и приблизительно в два раза выше для 6*S*-[¹⁸F]1 (16 %). 6*R*-[¹⁸F]1 и 6*S*-[¹⁸F]1 показали высокую стабильность *in vivo*. В образцах, взятых через 30 мин п.и. радиоактивных индикаторов, были обнаружены только исходные соединения в неизменном виде. 6*R*- и 6*S*-[¹⁸F]1 были еще более стабильными, чем радиоактивный индикатор на основе окисленной фолиевой кислоты, где в печени были обнаружены радиоактивные метаболиты. Блокирование FR-α посредством коинкубации радиоактивных индикаторов с избытком фолиевой кислоты приводило к ингибированию накопления радиоактивного фолата до менее, чем 0,2 %.

Пример 9: Исследования метаболитов

25 Фолатный радиоактивный индикатор 6*S*/6*R*-[¹⁸F]5 (соотношение 1:1, 53,7 – 52,3 МБк; ~ 0,62 – 1,15 нмоль) вводили внутривенно мышам, для того чтобы определить стабильность радиоактивных индикаторов *in vivo*. Мышей

умерщляли через 60 мин после инъекции радиоактивного индикатора, и собирали и анализировали кровь, мочу и печень. Охлажденный до температуры льда метанол, содержащий 10 мг/мл 2-меркаптоэтанола и 0,025 % (по объему) гидроксида аммония, добавляли к плазме крови, гомогенизированной печени и моче, для того чтобы осадить белки.⁶ После центрифугирования, супернатанты образцов плазмы крови, печени и мочи анализировали с помощью СВЭЖХ с радиометрическим детектированием (Фигура 4). Анализ образцов через 60 мин после введения радиоактивного индикатора обнаружил только исходный радиоактивный индикатор 6S/6R-[¹⁸F]1 в неизменном виде.

Пример 10: in vivo исследования восстановленных фолатов на основе ¹⁸F: 6R-3'-аза-2'-[¹⁸F]фтор-5-МТГФ (6R-[¹⁸F]1) и 6R-3'-аза-2'-[¹⁸F]фтор-5-МТГФ (6S-[¹⁸F]1)

Исследования биораспределения осуществляли с использованием 15 КВ-опухоленесущих мышей после введения им посредством инъекции 6R-3'-аза-2'-[¹⁸F]фтор-5-МТГФ (6R-[¹⁸F]1) соотв. 6S-3'-аза-2'-[¹⁸F]фтор-5-МТГФ (6S-[¹⁸F]1). Значения для трех моментов времени (через 30 мин, 60 мин и через 90 мин после инъекции радиоактивного индикатора) представлены в Таблице 1 и Таблице 2. Для прекращения исследований, мышам водили 100 мкг фолиевой кислоты за 10 мин до введения радиоактивного индикатора, и умерщляли через 60 мин п.и.

Таблица 1.

Биораспределение 6R-3'-аза-2'-[¹⁸F]фтор-5-МТГФ (6R-[¹⁸F]1) у КВ-опухоленесущих мышей на разные моменты времени после инъекции.

	6R-3'-аза-2'-[¹⁸ F]фтор-5-МТГФ (6R-[¹⁸ F]1) [% ВР/г]			
	30 мин п.и.	60 мин п.и.	90 мин п.и.	60 мин п.и. & фолиевая кислота
	n = 4	n = 4	n = 4	n = 3
Кровь	3,13 ± 0,31	2,16 ± 0,25	1,92 ± 0,19	1,52 ± 0,43
Сердце	2,75 ± 0,33	2,38 ± 0,18	2,39 ± 0,47	1,60 ± 0,46
Легкое	3,37 ± 0,32	2,80 ± 0,29	2,92 ± 0,53	1,73 ± 0,43
Селезенка	8,25 ± 0,96	8,25 ± 0,88	13,0 ± 4,14	3,89 ± 0,40
Печень	14,3 ± 1,36	14,1 ± 0,80	16,8 ± 3,58	9,64 ± 1,55
Желчный пузырь	37,5 ± 11,7	39,0 ± 22,17	56,7 ± 13,2	26,5 ± 16,6
Почки	34,5 ± 2,45	27,3 ± 3,07	29,8 ± 7,46	4,80 ± 1,94
Желудок	2,20 ± 0,23	2,35 ± 0,49	2,51 ± 0,42	2,02 ± 0,52
Кишечник	7,68 ± 1,28	6,93 ± 1,06	8,01 ± 2,72	5,23 ± 0,73

Кал	12,2 ± 3,54	17,8 ± 5,09	13,1 ± 6,07	15,2 ± 1,75
Слюнные железы	7,16 ± 0,51	6,49 ± 0,93	7,31 ± 1,17	2,61 ± 0,70
Мышцы	1,54 ± 0,13	1,36 ± 0,15	1,48 ± 0,31	1,05 ± 0,42
Кости	2,73 ± 0,14	2,43 ± 0,10	3,53 ± 0,90	1,51 ± 0,34
КВ-опухоль	13,3 ± 1,80	18,1 ± 2,86	23,9 ± 2,74	3,41 ± 0,88
Опух-кровь	4,27 ± 0,61	8,47 ± 1,62	12,5 ± 1,46	
Опух-печень	0,94 ± 0,14	1,29 ± 0,18	1,46 ± 0,26	
Опух-почка	0,39 ± 0,05	0,67 ± 0,14	0,83 ± 0,17	

показанные значения представляют собой среднее значение ± С.О. данных от трех - четырех животных

5 **Таблица 2.**

Биораспределение 6*S*-3'-аза-2'-[¹⁸F]фтор-5-МТГФ (6*S*-[¹⁸F]1) у КВ-опухоленесущих мышей на разные моменты времени после инъекции.

6 <i>S</i> -3'-аза-2'-[¹⁸ F]фтор-5-МТГФ (6 <i>S</i> -[¹⁸ F]1) [% ВР/г]				
	30 мин п.и.	60 мин п.и.	90 мин п.и.	60 мин п.и. & фолиевая кислота
	n = 4	n = 4	n = 4	n = 3
Кровь	1,52 ± 0,31	1,26 ± 0,08	1,16 ± 0,20	1,09 ± 0,28
Сердце	2,02 ± 0,22	1,53 ± 0,15	1,48 ± 0,17	0,50 ± 0,13
Легкое	2,31 ± 0,42	2,04 ± 0,09	2,08 ± 0,35	0,84 ± 0,20
Селезенка	1,90 ± 0,34	1,57 ± 0,16	1,82 ± 0,49	0,90 ± 0,24
Печень	8,10 ± 1,16	6,28 ± 0,66	5,86 ± 1,11	4,76 ± 0,87
Желчный пузырь	20,0 ± 9,00	16,6 ± 8,91	11,4 ± 7,18	5,87 ± 0,45
Почки	42,5 ± 2,73	37,5 ± 3,61	42,3 ± 7,05	2,28 ± 0,95
Желудок	2,54 ± 0,56	1,84 ± 0,33	1,69 ± 0,33	0,73 ± 0,32
Кишечник	2,61 ± 0,65	2,58 ± 0,42	2,34 ± 0,39	4,34 ± 0,93
Кал	3,71 ± 2,34	4,85 ± 1,95	4,57 ± 1,98	8,42 ± 2,10
Слюнные железы	13,8 ± 2,06	13,8 ± 1,28	21,4 ± 4,59	0,89 ± 0,26
Мышцы	1,36 ± 0,25	1,29 ± 0,14	1,24 ± 0,14	0,26 ± 0,06
Кости	1,70 ± 0,13	1,38 ± 0,14	1,49 ± 0,30	0,49 ± 0,12
КВ-опухоль	11,1 ± 0,90	14,2 ± 1,91	19,2 ± 4,16	2,11 ± 0,38
Опух-кровь	7,41 ± 0,96	11,3 ± 1,13	16,5 ± 0,59	
Опух-печень	1,38 ± 0,16	1,87 ± 0,96	3,30 ± 0,59	
Опух-почка	0,26 ± 0,01	0,38 ± 0,04	0,45 ± 0,07	

показанные значения представляют собой среднее значение ± С.О. данных от трех - четырех животных.

Исследования биораспределения выявили высокий уровень накопления в опухоли как для *6R*-, так и для *6S*-диастереоизомеров. Уже через 30 мин п.и. наблюдался высокий уровень накопления в опухоли, составляющий $13,3 \pm 1,80\%$ ВР/г для *6R*-[^{18}F]**1** и $11,13 \pm 0,90\%$ ВР/г для *6S*-[^{18}F]**1** (Фигура 5). Накопление в опухоли дополнительно возрастало с течением времени, до $23,9 \pm 2,74\%$ ВР/г для *6R*-изомера, и до $19,2 \pm 4,16\%$ ВР/г для *6S*-изомера через 90 мин п.и. Указанное значение приблизительно в два раза превышает накопление радиоактивности, полученное с использованием окисленного радиоактивного индикатора в виде 3'-аза-2'-[^{18}F]фторфолиевой кислоты ($12,59 \pm 1,77\%$ ВР/г).

Накопления в опухоли эффективно блокировали посредством предварительной инъекции фолиевой кислоты. Специфичность связывания в отношении опухоли составляла 85 % и 89 % для *R*- и *6S*-изомеров, соответственно. Значительно более высокий уровень радиоактивности был обнаружен в печени для *6R*-радиоактивного индикатора ($14,3 \pm 1,36\%$ ВР/г), если сравнивать с *6S*-радиоактивным индикатором ($8,10 \pm 1,16\%$ ВР/г), через 30 мин п.и. Через 90 мин п.и. накопление радиоактивности в печени немного возрастало для *6R*-изомера ($16,8 \pm 3,58\%$ ВР/г), тогда как уровни радиоактивности для *S*-изомера уменьшались ($5,86 \pm 1,11\%$ ВР/г). Накопление в селезенке заметно возрастало для *6R*-изомера уже через 30 мин п.и., а через 90 мин п.и. для *6R*-изомера наблюдали накопление в семь раз выше ($13,0 \pm 4,14\%$ ВР/г), если сравнивать с *6S*-изомером ($1,82 \pm 0,49\%$ ВР/г). Напротив, накопление в почках было значительно выше для *6S*-[^{18}F]**1** по сравнению с *6R*-[^{18}F]**1** через 30 мин п.и. (*6R*-форма: $34,5 \pm 2,45\%$ ВР/г, *6S*-форма: $42,5 \pm 2,73\%$ ВР/г), и оставалось почти постоянным с течением времени для обоих диастереоизомеров (через 90 мин п.и.: *6R*-форма: $29,8 \pm 7,46\%$ ВР/г, *6S*-форма: $42,3 \pm 7,05\%$ ВР/г). Однако, оба значения были значительно более низкими по сравнению с 3'-аза-2'-[^{18}F]фторфолиевой кислотой ($57,3 \pm 8,40\%$ ВР/г). Также наблюдалась значительная разница для двух диастереоизомеров в случае накопления в слюнных железах, где в слюнных железах через 90 мин п.и. было выявлено в три раза большее количество *6S*-изомера (*6R*-форма: $7,31 \pm 1,17\%$ ВР/г, *6S*-форма: $21,4 \pm 4,59\%$ ВР/г).

Соотношение опухоль-почка было значительно более низким для *6S*-[^{18}F]**1** (через 30 мин п.и.: $0,26 \pm 0,01\%$ ВР/г) и возрастало в 1,7 раза до значения $0,45 \pm 0,07\%$ ВР/г через 90 мин п.и. (Фигура 6). Напротив, соотношение опухоль-почка

6R-[¹⁸F]1 уже составляло $0,39 \pm 0,05$ % ВР/г через 30 мин п.и. и возрастало в 2,1 раза, до $0,83 \pm 0,17$ % ВР/г через 90 мин п.и. Таким образом, соотношение опухоль-почка 6R-[¹⁸F]1 приблизительно в два- и в четыре раза выше, если сравнивать с 6S-[¹⁸F]1 и 3'-аза-2'-[¹⁸F]фторфолиевой кислотой, соответственно.

5 Соотношение опухоль-печень было выше для 6S-изомера, по сравнению с 6R-изомером, на все исследуемые моменты времени, вследствие более низкого накопления в печени 6S-[¹⁸F]1. Таким образом, через 90 мин п.и. в печени наблюдается в три раза большее накопление 6R-[¹⁸F]1, по сравнению с 6S-изомером (6R-форма: $16,8 \pm 3,58$ % ВР/г, 6S-форма: $5,86 \pm 1,11$ % ВР/г). Более
10 низкое накопление S-изомера в печени является преимущественным с точки зрения визуализации, так как это позволяет разграничивать FR-положительные опухоли, которые расположены близко к печени. Соотношения опухоль-кровь постоянно возрастали с течением времени для обоих изомеров, при этом соотношения для 6S-изомера были значительно выше, если сравнивать с 6R-
15 изомером.

Зависимое от времени распределение в наиболее значимых органах и тканях показано на Фиг. 7 и 8.

Накопленная радиоактивность двух ¹⁸F-фолатных радиоактивных индикаторов в разных органах и тканях показана на Фиг. 9.

20 Соотношения опухоли к основным органам через 30 мин, 60 мин и через 90 мин после инъекции каждого радиоактивного индикатора показаны на Фиг. 10-12.

Пример 11: ПЭТ/КТ-визуализирующие методы исследования

25 План исследования представлен в Таблице 3.

Мышь 31	Мышь 32	Мышь 33	Мышь 34	Мышь 35	Мышь 36
-	-	Фолиевая кислота	-	-	Фолиевая кислота
¹⁸ F-6R-Aza-5MeTHF			¹⁸ F-6S-Aza-5MeTHF		
Скан: 1 ч п.и.	Скан: 1 ч п.и.	Скан: 1 ч п.и.	Скан: 1 ч п.и.	Скан: 1 ч п.и.	Скан: 1 ч п.и.
Скан: 2 ч п.и.	Скан: 2 ч п.и.	Скан: 2 ч п.и.	Скан: 2 ч п.и.	Скан: 2 ч п.и.	Скан: 2 ч п.и.
Скан: 3 ч п.и.	Скан: 3 ч п.и.	Скан: 3 ч п.и.	Скан: 3 ч п.и.	Скан: 3 ч п.и.	Скан: 3 ч п.и.

ПЭТ/КТ-изображения (проекции максимальной интенсивности (MIP)) каждой мыши, просканированной через 1 ч, 2 ч и 3 ч после инъекции радиоактивного индикатора, показаны на Фиг. 13 - 18.

Высокий уровень накопления в КВ опухолевых ксенотрансплантатах наблюдали для обоих радиоактивных индикаторов уже через 1 ч п.и., и при этом через 3 ч п.и опухоли были очень хорошо визуализированы с высокой степенью интенсивности для обеих соединений. Накопление радиоактивности в печени главным образом наблюдалось для 6*R*-изомера, однако, после 3 ч п.и. накопление в печени было лишь едва заметным. FR-положительные почки отчетливо визуализировались через 1 ч п.и. с использованием 6*R*-[¹⁸F]1, но при этом были почти невидимы через 3 ч п.и. Напротив, высокий уровень накопления в почках наблюдали для 6*S*-[¹⁸F]1 на все исследуемые моменты времени. Более того, высокий уровень накопления радиоактивности был замечен в слюнных железах. Прекращение исследований осуществляли посредством инъекции фолиевой кислоты за 10 минут до введения радиоактивных индикаторов, что приводило к заметному уменьшению накопления 6*R*-[¹⁸F]1 и 6*S*-[¹⁸F]1 во всех FR-положительных тканях (КВ-опухолевые ксенотрансплантаты, почки, слюнные железы и хориоидное сплетение) (Фигура 15 и Фигура 17).

На основании биораспределения и результатов ПЭТ визуализации, можно сделать заключение, что 6*S*-изомер предпочтительно выводится почками, тогда как 6*R*-изомер, по-видимому, главным образом выводится через гепатобилиарный путь.

Пример 12: Исследования накопления и интернализации клетками осуществляли в отношении трансфицированных FR-α и FR-β клеток CHO, называемых клетками RT16 и D4

Исследовали накопление и интернализацию окисленного (¹⁸F-AzaFol) и восстановленных ¹⁸F-фолатов (6*S*-изомер и 6*R*-изомер ¹⁸F-5-Me-Aza-THF) в клетках D4 и RT16, которые экспрессируют FR-α и FR-β, соответственно. Обе клеточные линии были любезно предоставлены Larry Matherly Wayne State University (Университет Уэйна), Детройт, США; Golani и др. J Med Chem, 2016, 59, 7856.

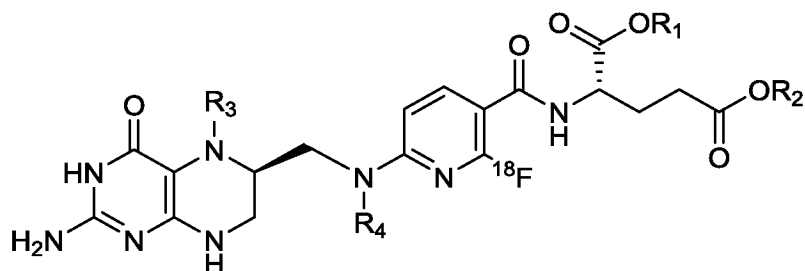
В случае использования опухолевых клеток RT16, которые экспрессируют FR- α , все три ^{18}F -фолатных радиоактивных индикатора (окисленный и восстановленные варианты) показали подобное накопление, которое варьируется в интервале между 43 и 50 % через 1 ч после инкубации и 56 и 66 % через 3 ч после инкубации. Интернализованная фракция радиоактивных индикаторов достигла 8 - 10 % через 1 ч после инкубации и немного возросла, до 9 - 12 %, через 3 ч после инкубации.

В случае использования клеток D4, которые экспрессируют FR- β , накопление ^{18}F -AzaFol и 6*S*-изомера восстановленного радиоактивного индикатора достигло приблизительно 70 % через 1 ч после инкубации и 80 % через 3 ч после инкубации. Интернализованная фракция ^{18}F -AzaFol и 6*S*-изомера восстановленного варианта составляла 20 % и 12 %, соответственно, через 1 ч после инкубации. Указанные количества немного повышались, когда время инкубации было продлено до 3 ч. Однако, при использовании указанных клеток D4 было обнаружено, что всего лишь 3 % восстановленного фолатного радиоактивного индикатора (6*R*-изомер) поглощалось, и приблизительно 1 % интернализовалось. После дополнительных двух часов инкубации изменений не наблюдалось.

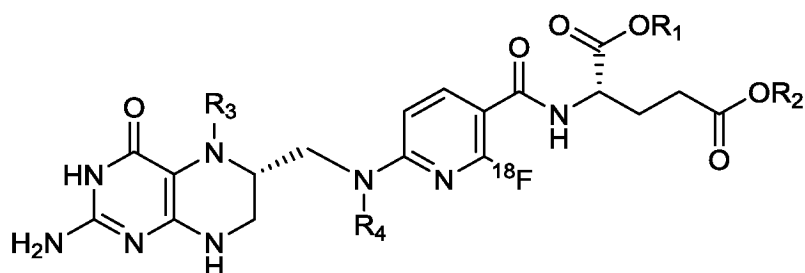
Значительное накопление ^{18}F -AzaFol и восстановленного варианта радиоактивного индикатора (6*S*-изомер) наблюдалось в случае использования клеток RT16 (FR- α), а также в случае использования клеток D4 (FR- β) (Фигура 23). 6*R*-изомер восстановленного фолата показал более высокое накопление в клетках RT16, указывая на FR- α -селективность, в то время как накопление в клетках D4 было очень низким (Фигура 24 и Фигура 25). Указанные результаты соответствуют гипотезе о том, что 6*R*-изомер (соответствующий природному варианту восстановленного фолата, который обозначают как 6*S*-5Me-TГФ), селективно связывается с FR- α .

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы Ia или Ib, предназначенное для применения во время диагностической визуализации *in vitro* или *in vivo* клетки или популяции клеток, экспрессирующих рецептор фолата, или для применения во время мониторинга злокачественного новообразования или воспалительных и аутоиммунных заболеваний и их лечения



Ia



Ib,

где

R_1, R_2 независимо друг от друга представляют собой H или неразветвленный или разветвленный C1-C6 алкил, и

R_3, R_4 независимо друг от друга представляют собой H, формил, или метил, или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение для применения по пункту 1, где

R_1, R_2 независимо друг от друга представляют собой H или неразветвленный или разветвленный C1-C6 алкил,

R_3 представляет собой метил, и

R_4 представляет собой H,

или его фармацевтически приемлемая соль.

10



R₁, R₂ независимо друг от друга представляют собой H, или C1-C12 алкил, или его фармацевтически приемлемая соль.

15



или его фармацевтически приемлемая соль.

5. Соединение для применения по любому из предыдущих пунктов, имеющее стереоизомерную чистоту, которая составляет более 99 %;

5 предпочтительно, имеющее стереоизомерную чистоту, которая составляет более 99,5 %.

6. Соединение для применения по любому из предыдущих пунктов, где фармацевтически приемлемые соли представляет собой соли щелочных или
10 щелочноземельных металлов, предпочтительно натриевую, калиевую, магниевую или кальциевую соль.

7. Способ диагностической визуализации клетки или популяции клеток, экспрессирующих рецептор фолата, причем указанный способ содержит стадии
15 введения по меньшей мере одного соединения по пунктам 1 - 6 в диагностически визуализируемом количестве, и получения диагностического изображения указанной клетки или популяции клеток.

8. Способ по пункту 7, где диагностическую визуализацию клетки или
20 популяции клеток, экспрессирующих рецептор фолата, проводят *in vitro* или *in vivo*.

9. Способ по пункту 7 или 8, где проводят диагностическую
25 визуализацию клеток карциномы яичников человека.

10. Способ обнаружения *in vitro* в образце ткани клетки, экспрессирующей рецептор фолата, который включает приведение в контакт
указанного образца ткани с соединением по пунктам 1 - 6 в эффективном
количестве и на протяжении достаточного периода времени и достаточных
30 условий, для того чтобы произошло связывание, и обнаружение такого связывания с помощью таких методов, как автордиография, и подобные.

11. Способ диагностической визуализации или мониторинга субъекта, содержащий стадии (I) введения субъекту по меньшей мере одного соединения

по пунктам 1 - 6 в диагностически визуализируемом количестве, и (II) проведения диагностической визуализации с использованием метода ПЭТ посредством обнаружения сигнала от указанного по меньшей мере одного соединения.

5

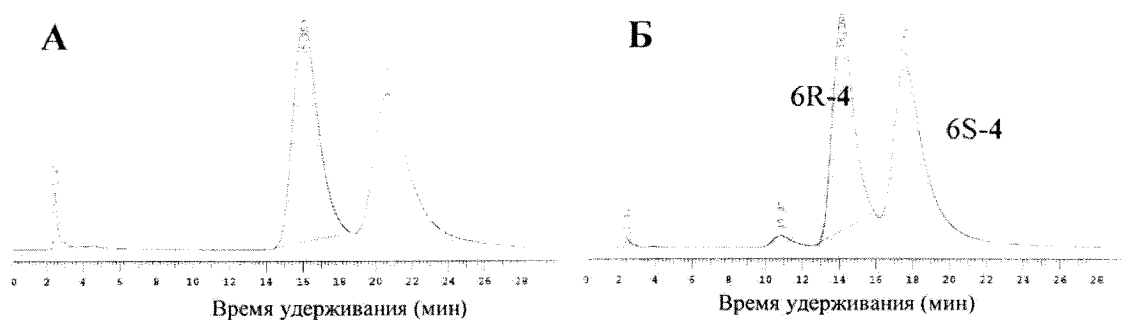
12. Способ мониторинга лечения злокачественного новообразования или воспалительного и аутоиммунного заболевания у субъекта, содержащий стадии (I) введения субъекту, нуждающемуся в этом, по меньшей мере одного соединения по пунктам 1 - 6 в диагностически визуализируемом количестве, в сочетании с терапевтически активным количеством, и (II) проведения диагностической визуализации с использованием метода ПЭТ посредством обнаружения сигнала от указанного по меньшей мере одного соединения, для отслеживания курса лечения злокачественного новообразования или воспалительного и аутоиммунного заболевания.

10

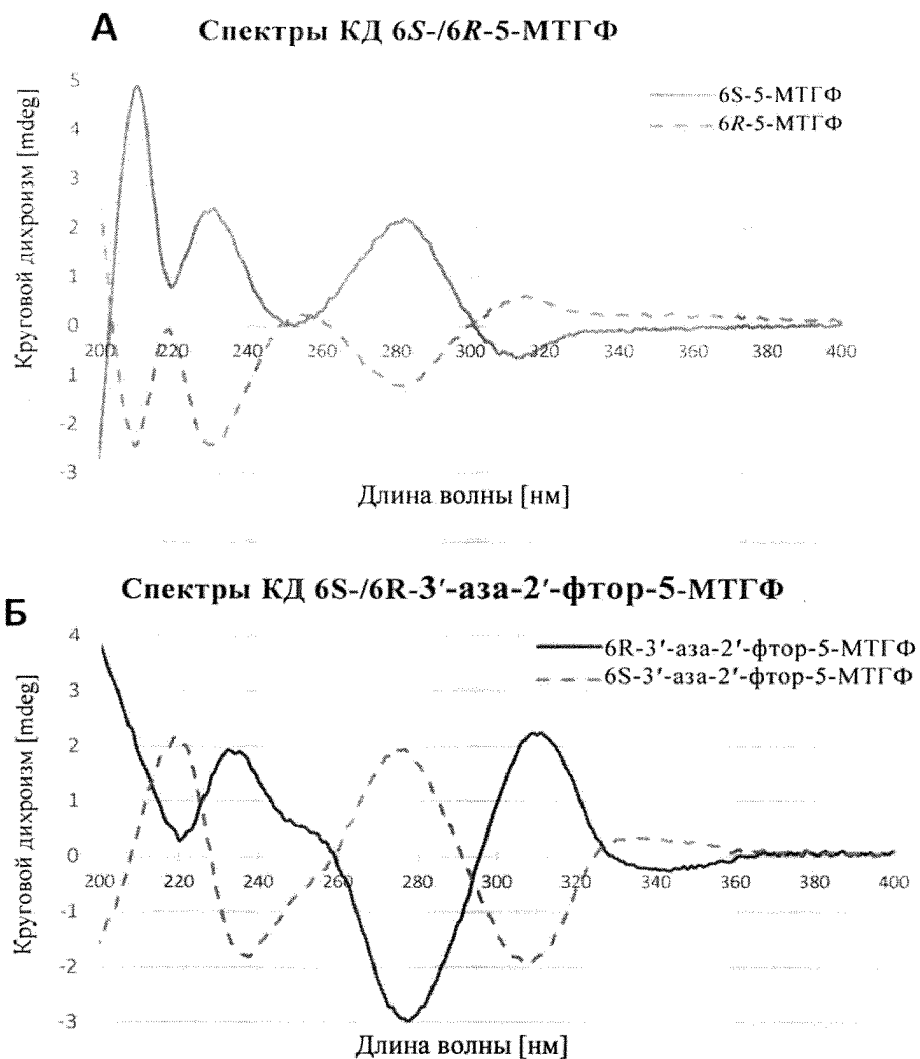
15

13. Способ по пунктам 1 - 6, применяемый в комбинации с любыми другими способами диагностики или лечения злокачественного новообразования или воспалительного и аутоиммунного заболевания.

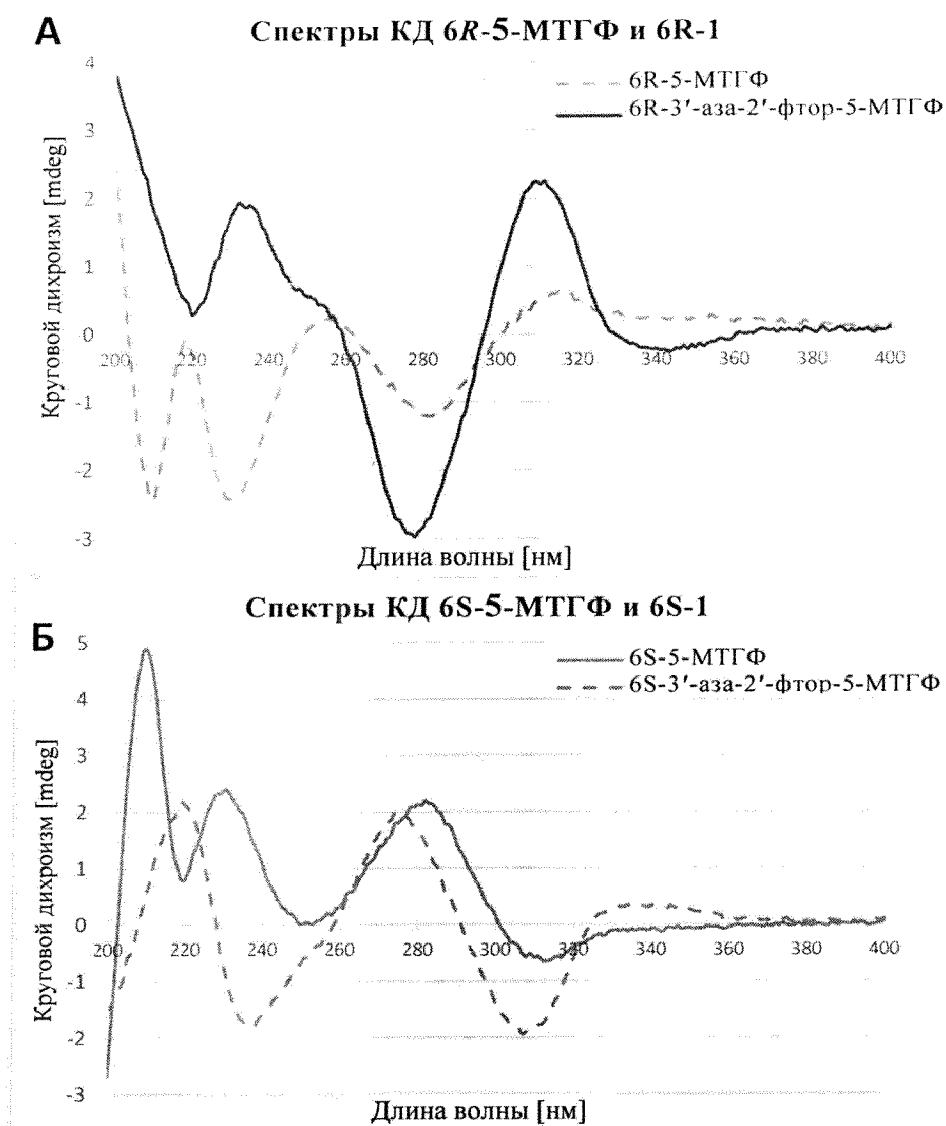
Фигуры



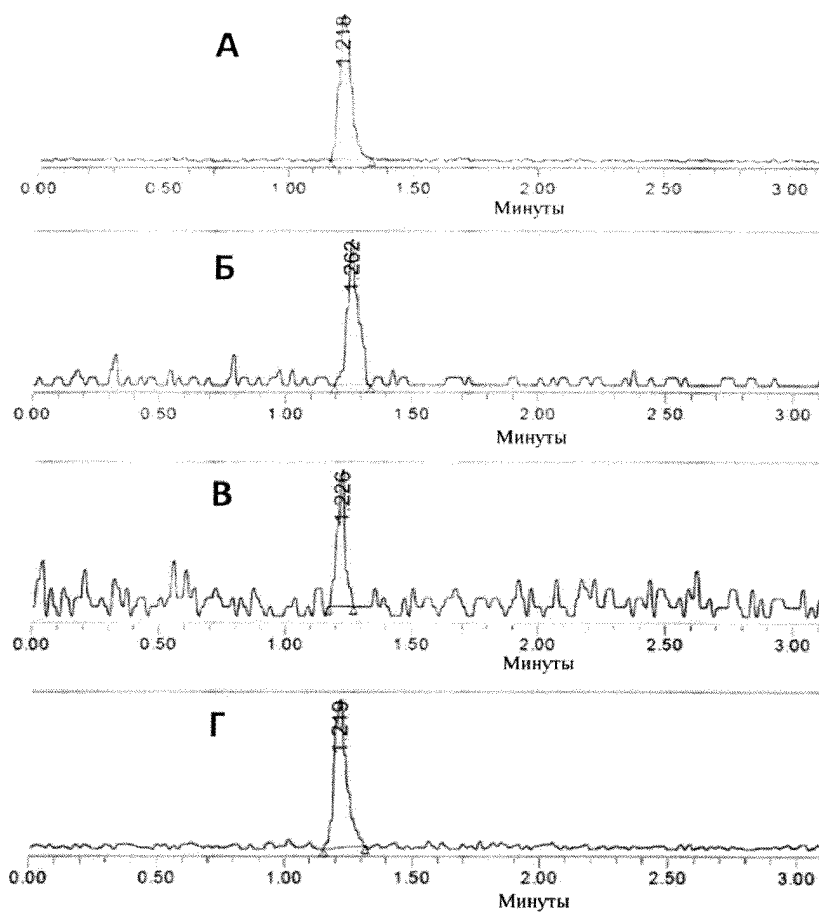
Фигура 1. Хроматограммы хиральной ВЭЖХ предшественника, сложного ди-*трет*-бутилового эфира N^2 -ацетил-3'-аза-2'-хлор-5-метилтетрагидрофолата, форм 6*S*-2 и 6*R*-2 (А) и эталонного сложного ди-*трет*-бутилового эфира N^2 -ацетил-3'-аза-2'-фтор-5-метилтетрагидрофолата форм 6*S*-2 и 6*R*-2 с защитной группой (Б).



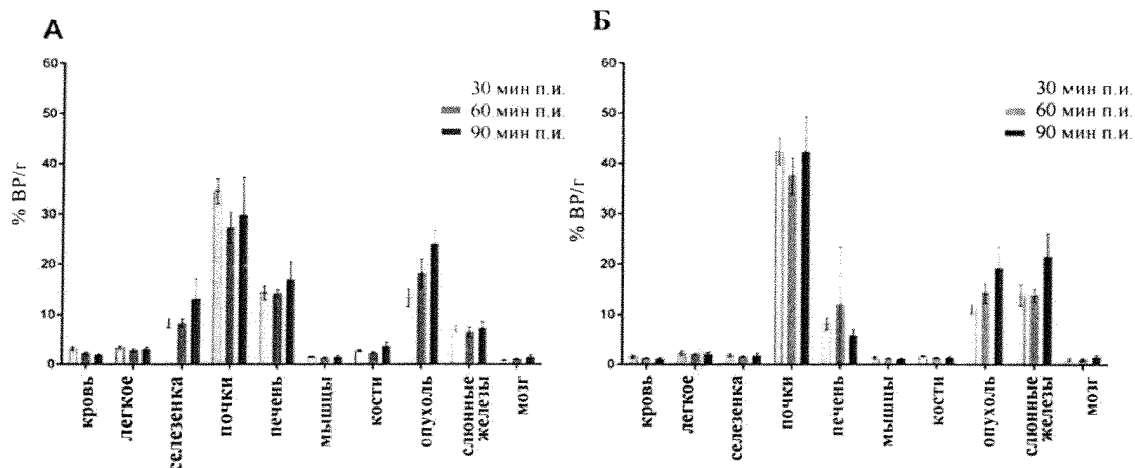
Фигура 2. Спектры КД 6*S*- и 6*R*-5-МТГФ (А) и 6*R*-1 и 6*S*-1 (Б) в диапазоне от 400 нм до 200 нм.



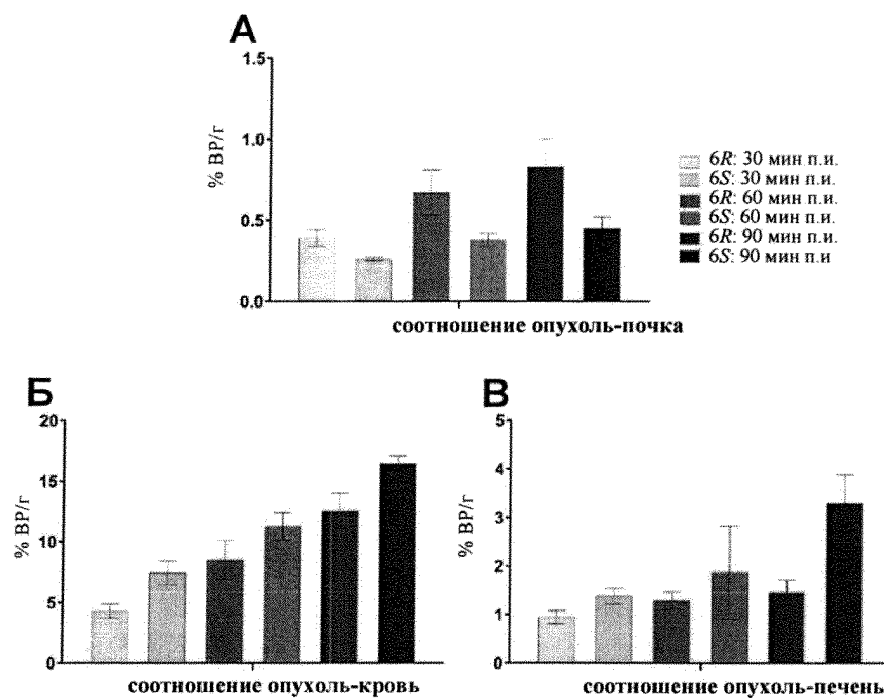
Фигура 3. Наложение спектров КД 6S-5-МТГФ и 6S-3'-аза-2'-фтор-5-МТГФ (А) и 6R-5-МТГФ и 6R-3'-аза-2'-фтор-5-МТГФ (Б).



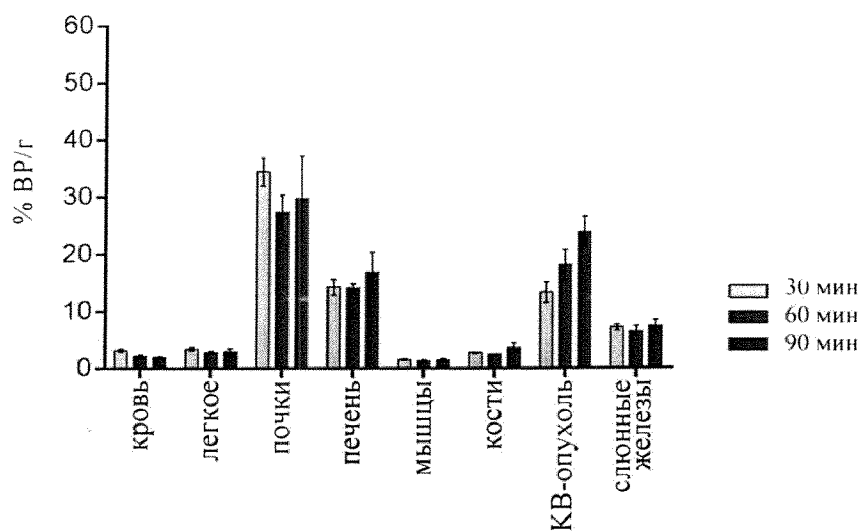
Фигура 4. Хроматограммы СВЭЖХ с радиометрическим детектированием эталонного радиоактивного индикатора 6S/6R-[¹⁸F]1 (А), образца печени (Б), плазмы крови (В) и образца мочи (Г) через 60 мин после инъекции 6S/6R-[¹⁸F]1. Время удерживания указано поверх пика.



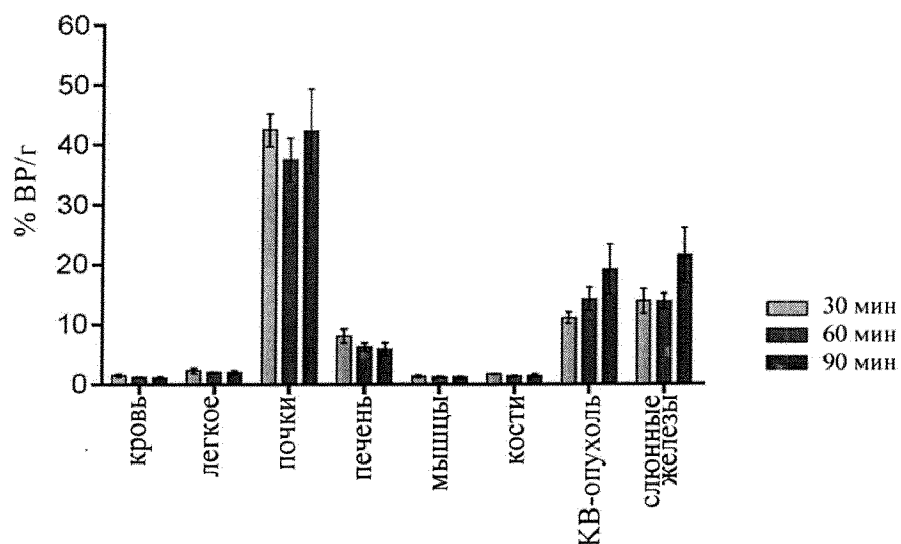
Фигура 5. Накопление радиоактивности 6R-3'-аза-2'-[¹⁸F]фтор-5-МТГФ (А) и 6S-3'-аза-2'-[¹⁸F]фтор-5-МТГФ (Б) в некоторых выбранных тканях через 30, 60 и 90 мин п.и.



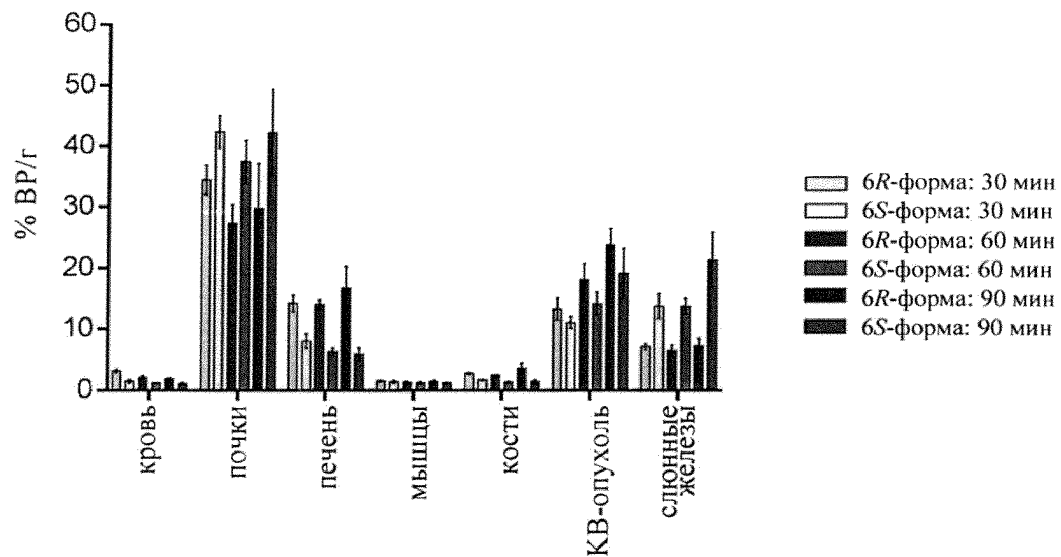
Фигура 6. Сравнение соотношений опухоль-почка (А), опухоль-кровь (Б) и опухоль-печень (Б) для 6R-[¹⁸F]1 и 6S-[¹⁸F]1.



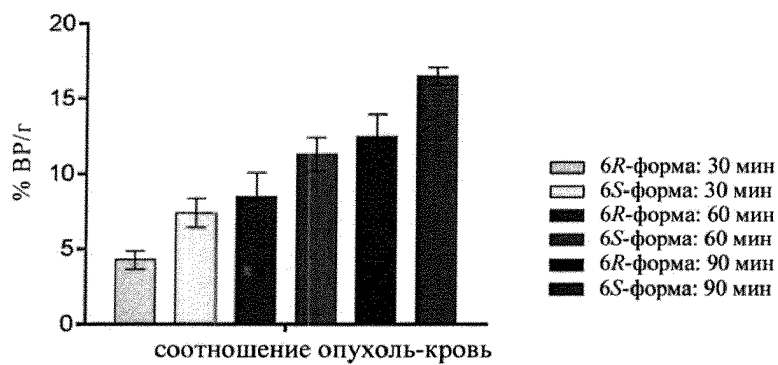
Фигура 7. Профиль распределения в тканях ^{18}F -6R-5Me-AzaTHF через 30, 60 и через 90 мин после инъекции.



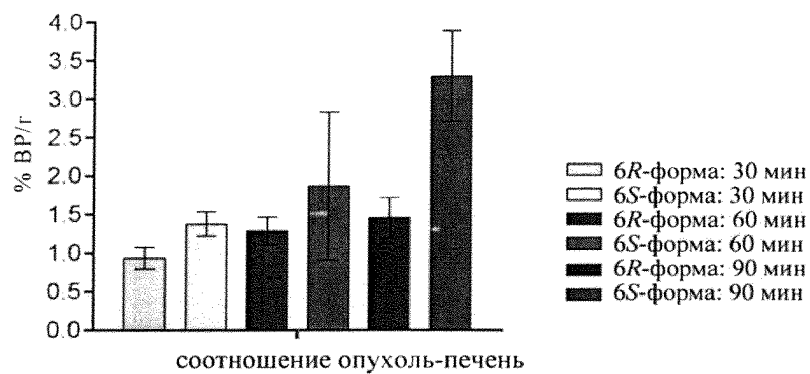
Фигура 8. Профиль распределения в тканях ^{18}F -6S-5Me-AzaTHF через 30, 60 и через 90 мин после инъекции.



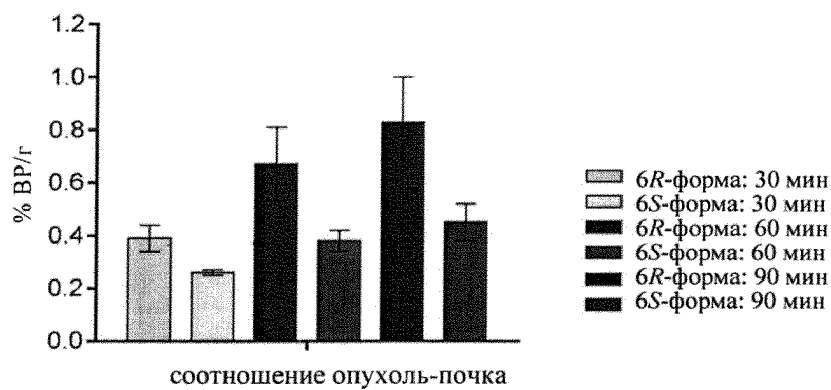
Фигура 9. Сравнение профиля распределения в тканях ^{18}F -6R-5Me-AzaTHF (6R-форма) и ^{18}F -6S-5Me-AzaTHF (6S-форма).



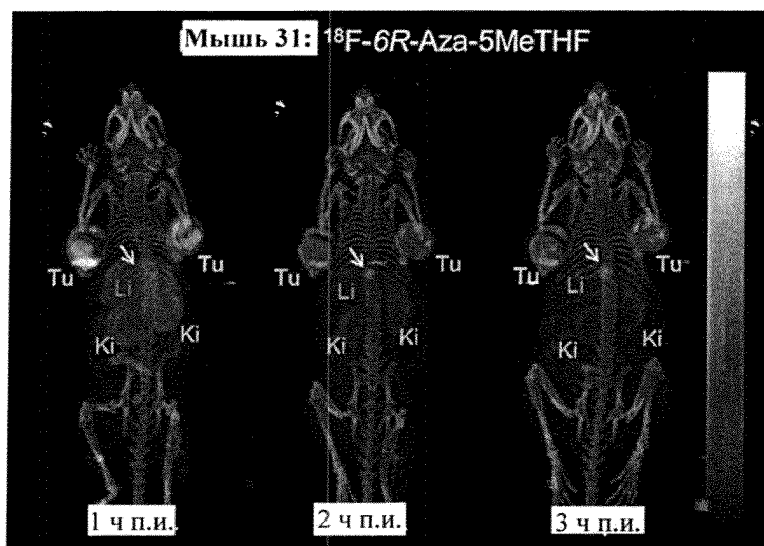
Фигура 10. Сравнение соотношений опухоль-кровь для ^{18}F -6R-5Me-AzaTHF (6R-форма) и для ^{18}F -6S-5Me-AzaTHF (6S-форма).



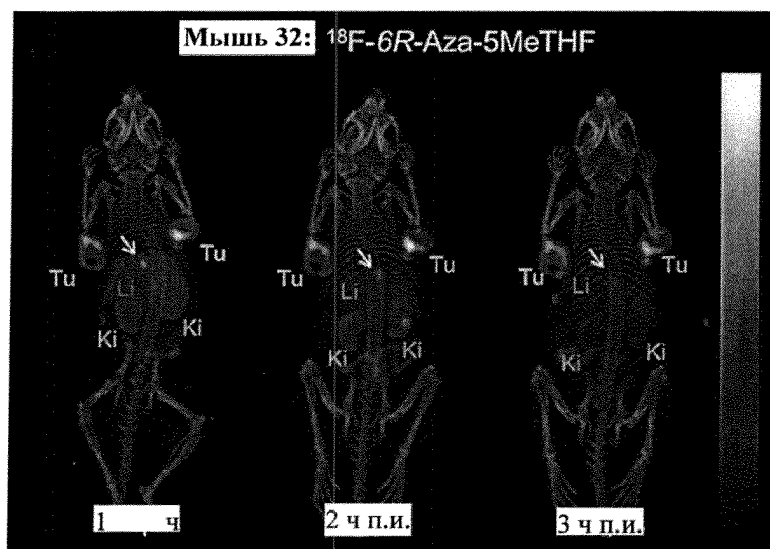
Фигура 11. Сравнение соотношений опухоль-печень для ^{18}F -6R-5Me-AzaTHF (6R-форма) и для ^{18}F -6S-5Me-AzaTHF (6S-форма).



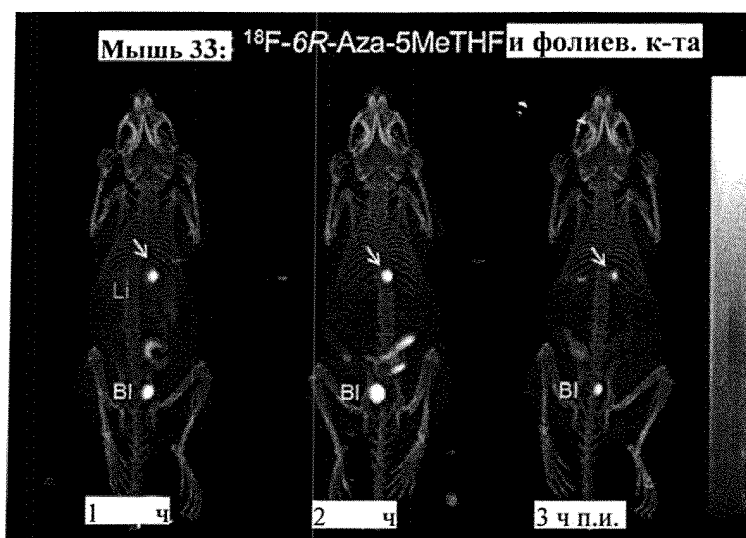
Фигура 12. Сравнение соотношений опухоль-почка для ^{18}F -6R-5Me-AzaTHF (6R-форма) и для ^{18}F -6S-5Me-AzaTHF (6S-форма).



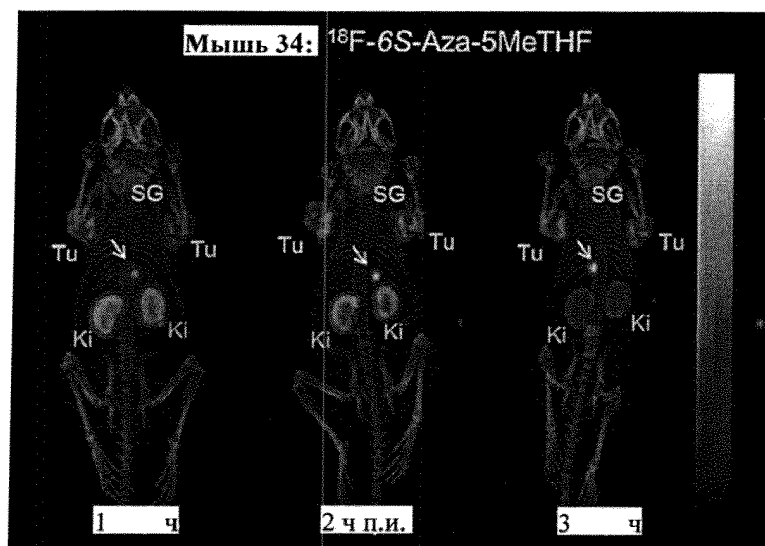
Фигура 13. Сканограммы ПЭТ/КТ КВ-опухоленесущей мыши через 1 ч, 2 ч и 3 ч после инъекции ^{18}F -6R-Aza-5MeTHF. (Tu = опухолевые ксенотрансплантаты, Li = печень, Ki = почка, белая стрелка = желчный пузырь).



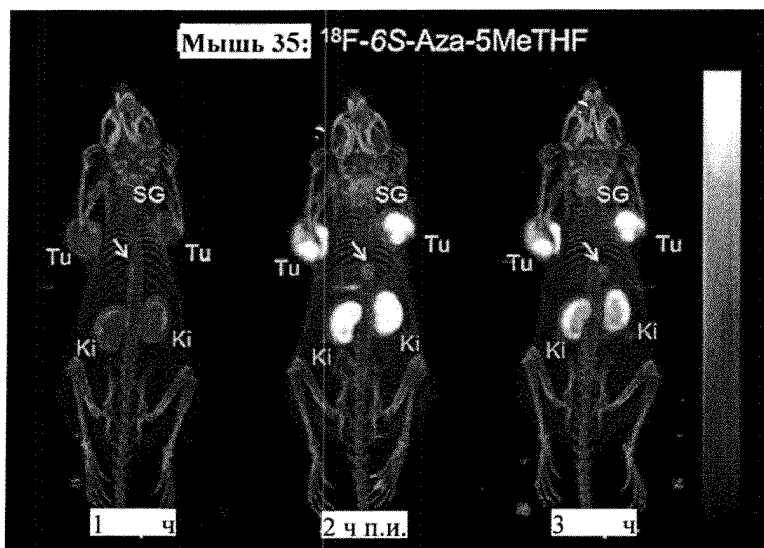
Фигура 14. Сканограммы ПЭТ/КТ КВ-опухоленесущей мыши через 1 ч, 2 ч и 3 ч после инъекции ^{18}F -6R-Aza-5MeTHF. (Tu = опухолевые ксенотрансплантаты, Li = печень, Ki = почка, белая стрелка = желчный пузырь).



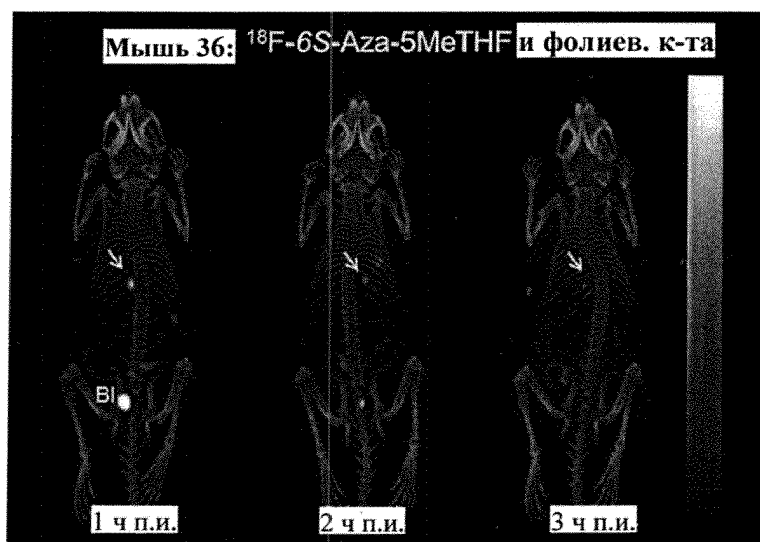
Фигура 15. Сканограммы ПЭТ/КТ КВ-опухоленесущей мыши через 1 ч, 2 ч и 3 ч после инъекции избытка фолиевой кислоты до введения ^{18}F -6R-Aza-5MeTHF. (Li = печень, белая стрелка = желчный пузырь).



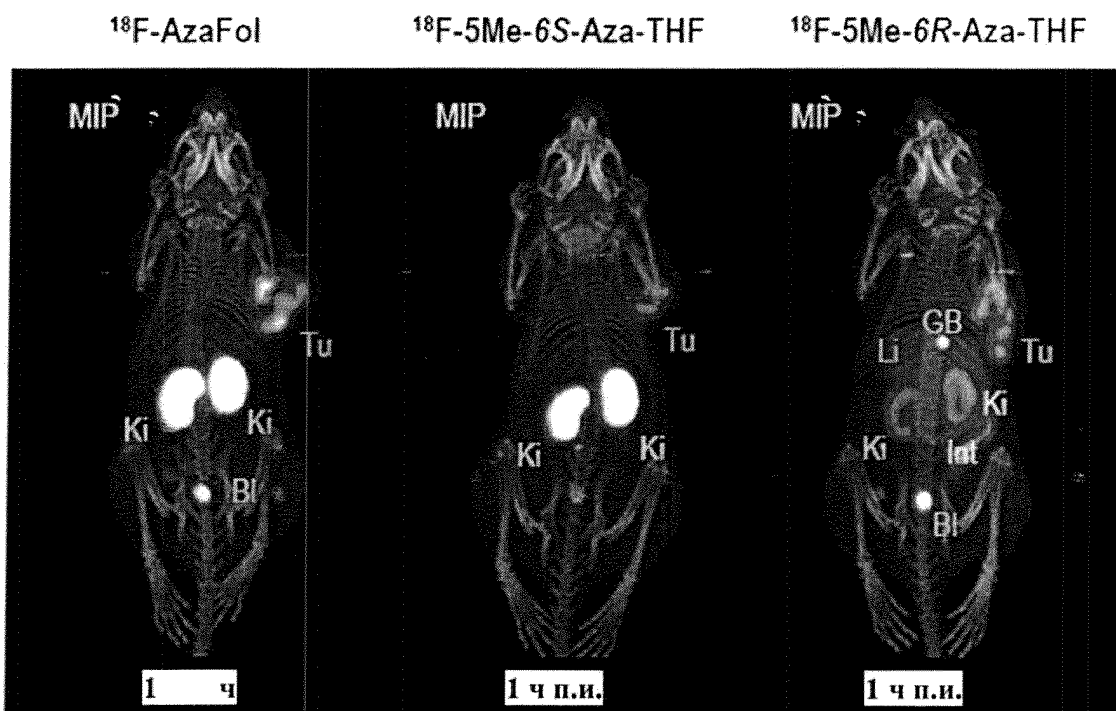
Фигура 16. Сканограммы ПЭТ/КТ КВ-опухоленесущей мыши через 1 ч, 2 ч и 3 ч после инъекции ^{18}F -6S-Aza-5MeTHF. (Tu = опухолевые ксенотрансплантаты, Ki = почка, SG = слюнные железы, белая стрелка = желчный пузырь, зеленая стрелка = хориоидное сплетение).



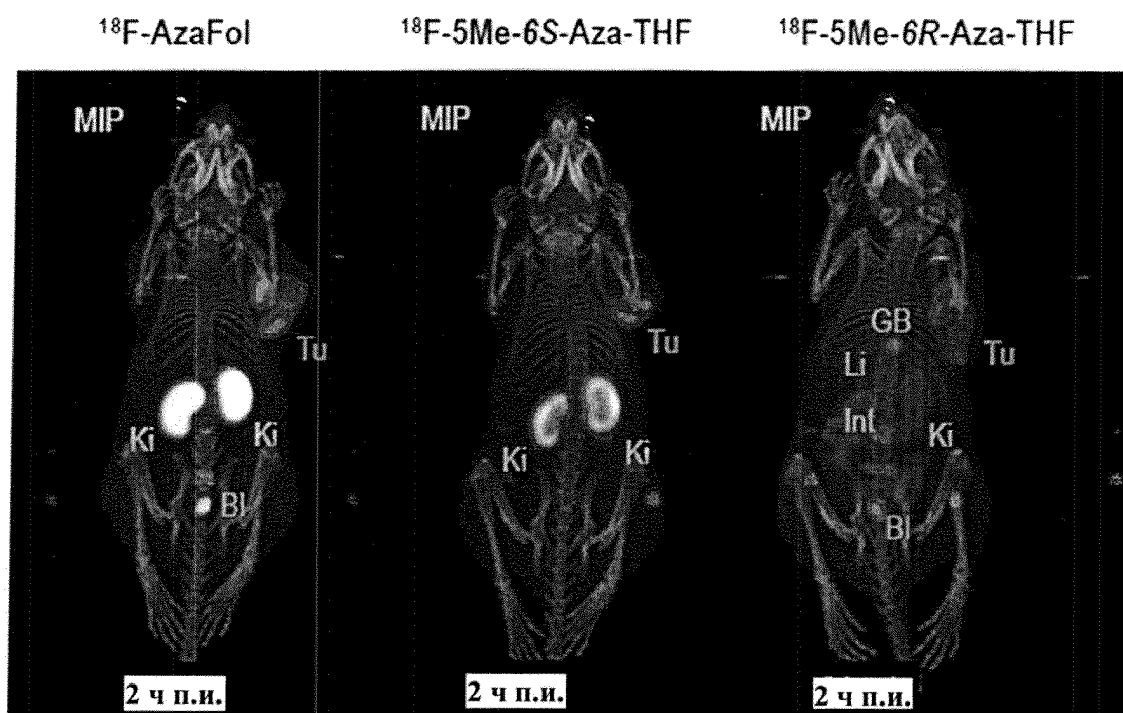
Фигура 17. Сканограммы ПЭТ/КТ КВ-опухоленесущей мыши через 1 ч, 2 ч и 3 ч после инъекции ^{18}F -6S-Aza-5MeTHF. (Tu = опухолевые ксенотрансплантаты, Ki = почка, SG = слюнные железы, белая стрелка = желчный пузырь, зеленая стрелка = хориоидное сплетение).



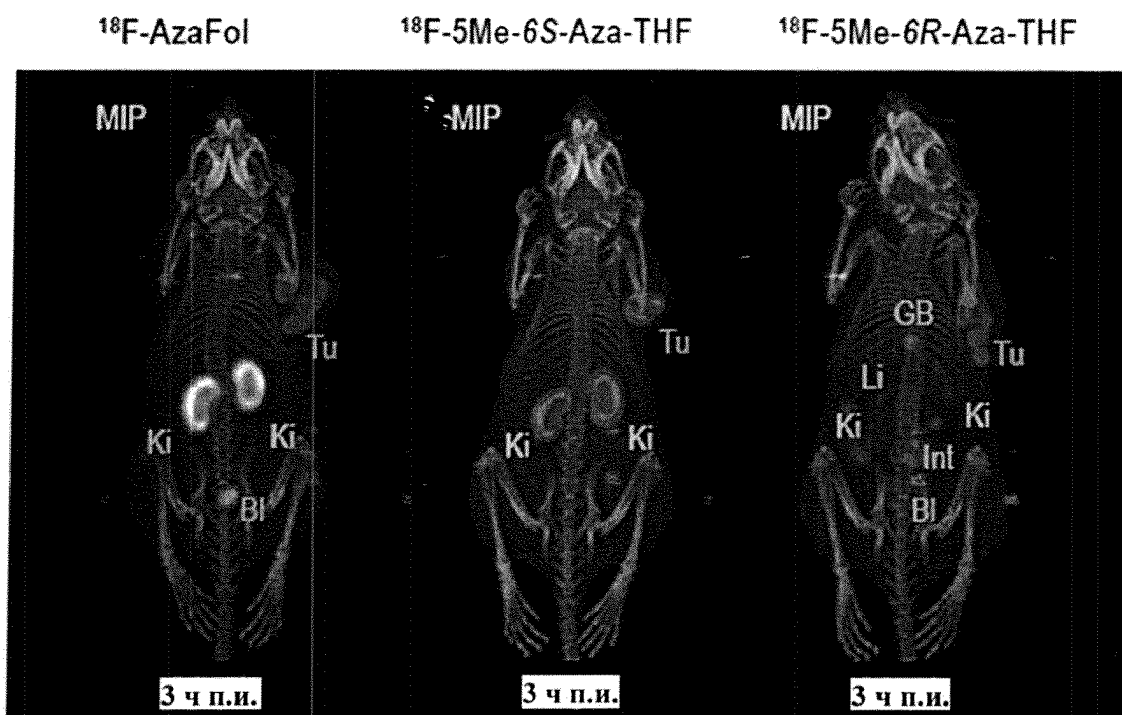
Фигура 18. Сканограммы ПЭТ/КТ КВ-опухоленесущей мыши через 1 ч, 2 ч и 3 ч после инъекции избытка фолиевой кислоты до введения ^{18}F -6S-Aza-5MeTHF. (BI = мочевого пузырь, белая стрелка = желчный пузырь).



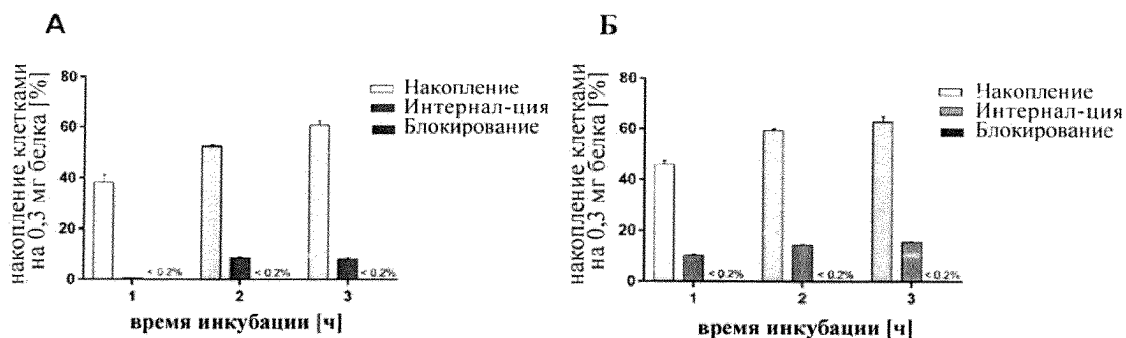
Фигура 19. Сканограммы ПЭТ/КТ опухоленесущей IGROV-1 (клеточной линии карциномы яичников человека) мыши через 1 ч после инъекции ^{18}F -AzaFol, ^{18}F -5Me-6S-Aza-THF и ^{18}F -5Me-6R-Aza-THF (Tu = опухолевые ксенотрансплантаты, Ki = почка, SG = слюнные железы, белая стрелка = желчный пузырь, зеленая стрелка = хориоидное сплетение).



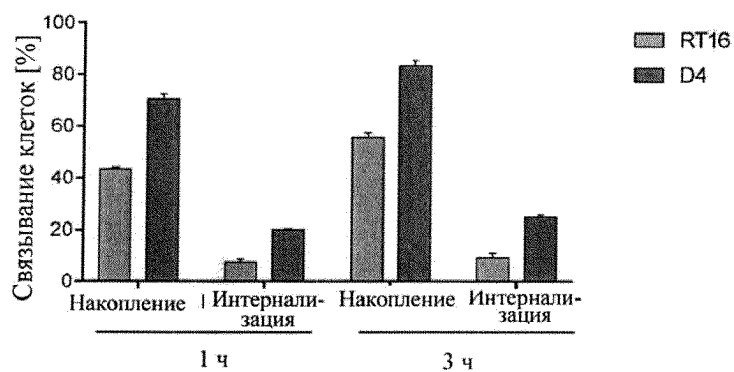
Фигура 20. Сканограммы ПЭТ/КТ опухоленесущей IGROV-1 (клеточной линии карциномы яичников человека) мыши через 2 ч после инъекции ^{18}F -AzaFol, ^{18}F -5Me-6S-Aza-THF и ^{18}F -5Me-6R-Aza-THF (Tu = опухолевые ксенотрансплантаты, Ki = почка, SG = слюнные железы, белая стрелка = желчный пузырь, зеленая стрелка = хориоидное сплетение).



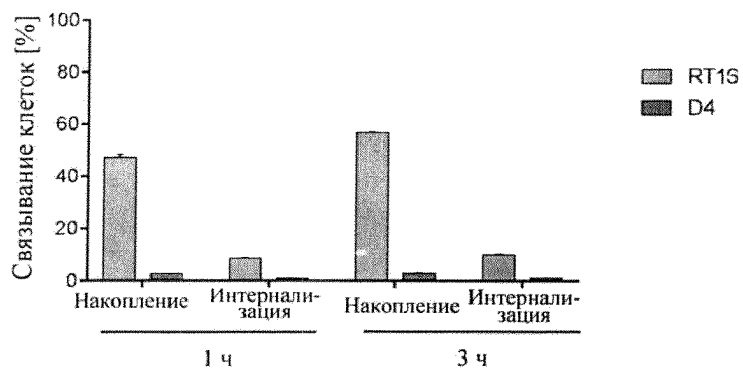
Фигура 21. Сканограммы ПЭТ/КТ опухоленесущей IGROV-1 (клеточной линии карциномы яичников человека) мыши через 3 ч после инъекции ^{18}F -AzaFol, ^{18}F -5Me-6S-Aza-THF и ^{18}F -5Me-6R-Aza-THF (Tu = опухолевые ксенотрансплантаты, Ki = почка, SG = слюнные железы, белая стрелка = желчный пузырь, зеленая стрелка = хориоидное сплетение).



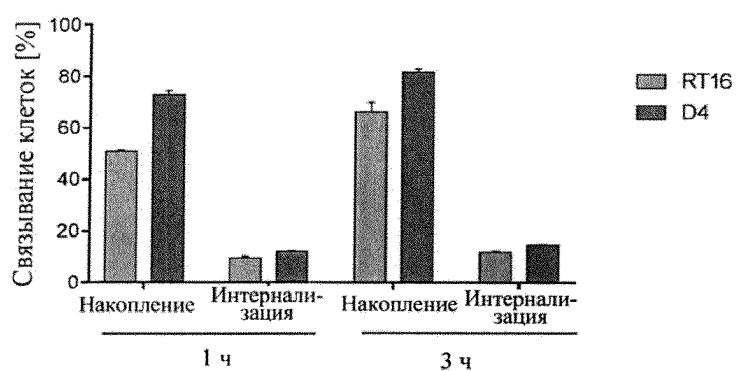
Фигура 22. Накопление и интернализация 6R-[^{18}F]1 (А) или 6S-[^{18}F]1 (Б) с FR-положительными КВ клетками, инкубируемыми при температуре 37 °С на протяжении 1, 2, или 3 ч. Прекращение исследований осуществляли посредством применения избытка фолиевой кислоты.



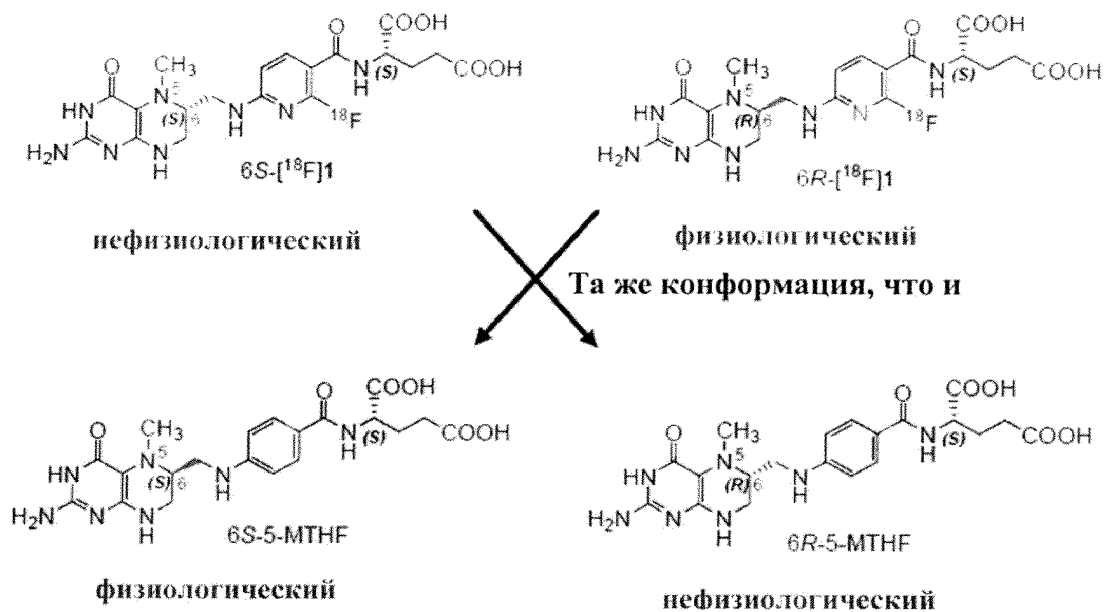
Фигура 23. Суммарное накопление и интернализация ^{18}F -AzaFol, с использованием клеточных линий RT16 (FR- α) и D4 (FR- β).



Фигура 24. Суммарное накопление и интернализация 6*R*-3-аза-2-¹⁸F-5-МТГФ с использованием клеточных линий RT16 (FR- α) и D4 (FR- β).



Фигура 25. Суммарное накопление и интернализация 6*S*-3-аза-2-¹⁸F-5-МТГФ с использованием клеточных линий RT16 (FR- α) и D4 (FR- β).



Фигура 26. Структура и стереохимическое обозначение восстановленных ^{18}F -фолатов и нефторированных изомеров.