

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 038019

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2021.06.23

(21) Номер заявки  
201892635

(22) Дата подачи заявки  
2017.05.17

(51) Int. Cl. *A61K 51/08* (2006.01)  
*A61K 101/02* (2006.01)

## (54) ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ ДЛЯ ПЭТ-ВИЗУАЛИЗАЦИИ

(31) 62/338,872

(32) 2016.05.19

(33) US

(43) 2019.04.30

(86) PCT/US2017/033004

(87) WO 2017/201111 2017.11.23

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

(72) Изобретатель:  
Доннелли Дэвид Дж., Бой Кеннет М.,  
Чжан Юньхуай, Ким Джоннион, Пена  
Адриенне (US)

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

(56) MAUTE ROY L ET AL.: "Engineering high-affinity PD-1 variants for optimized immunotherapy and immuno-PET imaging", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 112, no. 47, November 2015 (2015-11), pages E6506-E6514, XP002772779, ISSN: 0027-8424 abstract page E6512, left-hand column, paragraph 2

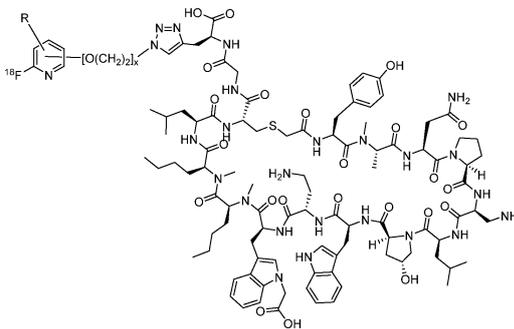
WO-A1-2014151634

WO-A1-2013010573

WO-A1-2016077518

WO-A1-2016086021

(57) Изобретение относится к соединению формулы (I)



(I)

или его фармацевтически приемлемой соли, способу получения изображения распределения указанного соединения, способу мониторинга прогрессирования заболевания у субъекта, способу количественного определения пораженных заболеванием клеток или тканей у субъекта, способу получения количественного изображения тканей или клеток, экспрессирующих PD-L1, способу скрининга агента для лечения заболевания и к фармацевтической композиции, содержащей указанное соединение.

038019 B1

038019 B1

### Перекрестная ссылка на родственную заявку

По этой заявке испрашивается приоритет по предварительной патентной заявке США с серийным № 62/338872, поданной 19 мая 2016 г., которая включена посредством ссылки в полном объеме.

Настоящее изобретение в целом относится к иммуномодуляторам, содержащим  $^{18}\text{F}$ -простетические группы, и синтезу и применению иммуномодуляторов с меткой  $^{18}\text{F}$  для визуализации различных процессов в организме, для обнаружения местоположения молекул, связанных с патологией заболевания, и для мониторинга развития заболевания.

Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) представляет собой неинвазивный способ визуализации, который стал одним из наиболее широко используемых способов диагностической медицины и разработки лекарственных средств с высокой чувствительностью (фмоли), высоким разрешением (4-10 мм) и тканевой аккрецией, которая может быть измерена количественно. Ценная функциональная информация *in vivo* о биологических процессах у живых субъектов, получаемая с помощью ПЭТ-визуализации, также дает уникальное преимущество для трансляционной медицины, поскольку тот же самый инструмент можно использовать как доклинически, так и клинически.

ПЭТ опирается на разработку и синтез молекул, меченных позитронно-излучающими радионуклеотидами, включая  $^{18}\text{F}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{94}\text{mTc}$ ,  $^{86}\text{Y}$  и  $^{124}\text{I}$ . *In vivo* эти радиотрассеры или радиолиганды испускают позитроны из ядра изотопа с разными энергиями в зависимости от используемого изотопа. Энергия выталкиваемого позитрона управляет средним расстоянием, на которое он перемещается, прежде чем он сталкивается с электроном, что приводит к испусканию двух гамма-лучей 511 кэВ в противоположных направлениях. Гамма-лучи, создаваемые этим событием аннигиляции позитрона, детектируются сканером ПЭТ-визуализации для получения плоских и томографических изображений, которые показывают распределение радиотрассера в зависимости от времени. Соответственно изотопы, представляющие собой излучатели чистого позитрона с изотопами с низкой энергией выталкивания, являются предпочтительными для ПЭТ-визуализации для минимизации расстояния, пройденного позитроном до аннигиляции и проблем дозиметрии, вызванных другими излучениями, такими как гамма-лучи, альфа-частицы или бета-частицы.

Кроме того, период полураспада изотопа, используемого при ПЭТ-визуализации, должен быть достаточно продолжительным для того, чтобы обеспечить синтез и анализ молекулы радиотрассера, инъекцию пациенту, локализацию *in vivo*, освобождение от нецелевых тканей и получение четкого изображения.  $^{18}\text{F}$  ( $\beta^+$  635 кэВ 97%,  $t_{1/2}$  110 мин) является одним из наиболее широко используемых ПЭТ-излучающих изотопов из-за его низкой энергии излучения позитрона, отсутствия побочных излучений и подходящего периода полураспада.

Настоящее изобретение относится к миламолекуле, замещенной простетической группой, меченой  $^{18}\text{F}$ , которая содержит нитропиридин, связанный с фрагментом полиэтиленгликоля (ПЭГ) и концевым азидом. В конкретных вариантах выполнения изобретения миламолекулы, содержащие бифункциональные конъюгирующие фрагменты (например, с ограниченными кольцом алкильными группами), образуют ковалентные связи с концевым азидом простетической группы, меченой  $^{18}\text{F}$ , посредством биортогональной "клик" реакции с получением зондов с радиометкой, которые являются устойчивыми в физиологических условиях. УФ-поглощение полученного продукта дополнительно обеспечивает практический, чувствительный и быстрый аналитический способ определения радиохимической чистоты продукта. Эти миламолекулы, меченные  $^{18}\text{F}$ , пригодны для обнаружения присутствия PD-L1 в клетках и тканях, таких как опухоли, что может предоставить ценную информацию для лечения.

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

#### Краткое описание чертежей

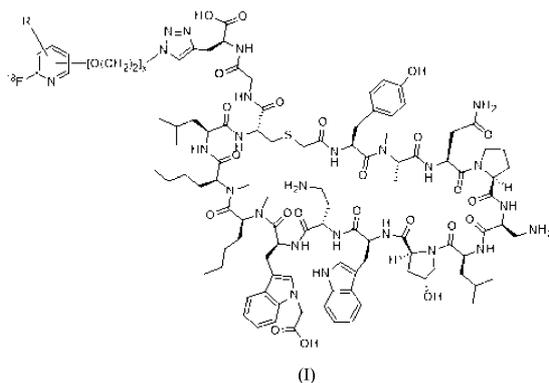
На фиг. 1 представлены репрезентативные ПЭТ/КТ изображения макроциклического пептида PD-L1, меченого [ $^{18}\text{F}$ ], у мышей, несущих билатеральные ксенотрансплантатные опухоли PD-L1 (+) L2987 и PD-L1 (-).

На фиг. 2 приведены усредненные кривые активности во времени для макроциклических пептидных радиотрассеров PD-L1, меченных [ $^{18}\text{F}$ ].

На фиг. 3 представлены репрезентативные ПЭТ изображения макроциклического пептидного радиотрассера PD-L1, меченого [ $^{18}\text{F}$ ], у примата, не являющегося человеком.

На фиг. 4 показаны авторадииограммные изображения макроциклического пептидного радиотрассера PD-L1, меченого [ $^{18}\text{F}$ ], в ксенотрансплантате (A & B) и биопсированных тканях немелкоклеточного рака легких человека (C & D).

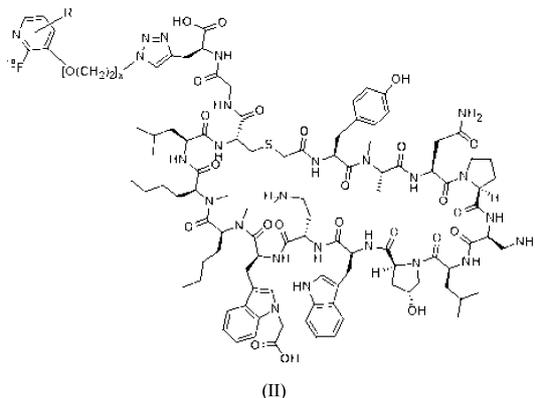
В своем первом аспекте настоящее изобретение относится к соединению формулы (I)



(I)

или его фармацевтически приемлемой соли, где  $x$  представляет собой целое число от 1 до 8, и R представляет собой  $C_1$ - $C_6$  алкильную группу.

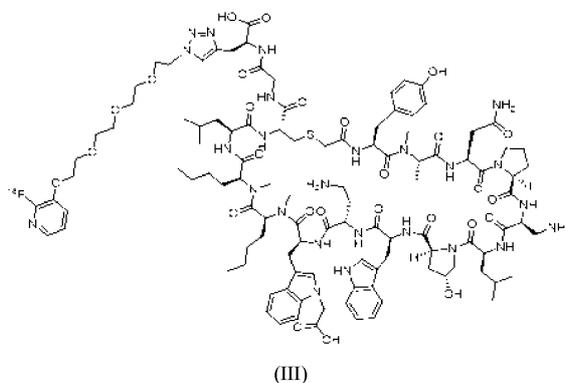
Во втором аспекте настоящее изобретение относится к соединению формулы (II)



(II)

или его фармацевтически приемлемой соли, где  $x$  представляет собой целое число от 1 до 8, и R представляет собой  $C_1$ - $C_6$  алкильную группу.

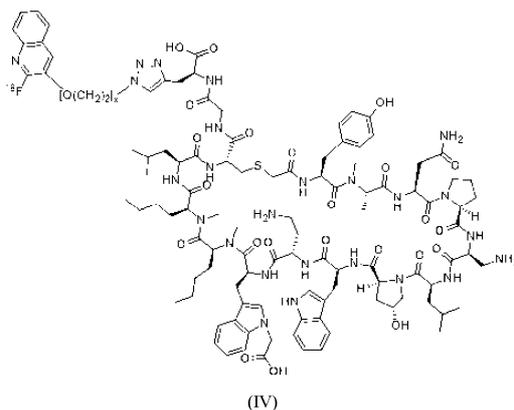
В третьем аспекте настоящее изобретение относится к соединению формулы (III)



(III)

или его фармацевтически приемлемой соли.

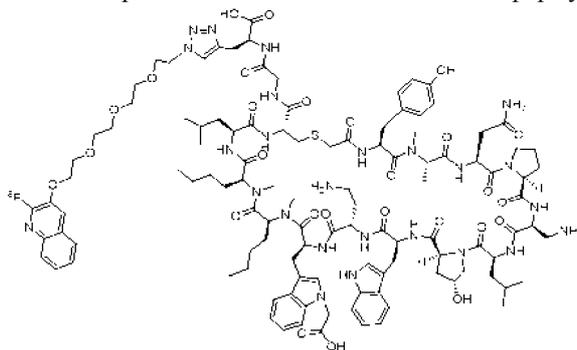
В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к соединению формулы (IV)



(IV)

или его фармацевтически приемлемой соли, где  $x$  представляет собой целое число от 1 до 8, и  $R$  представляет собой  $C_1$ - $C_6$  алкильную группу.

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к соединению формулы (V)



(V)

или его фармацевтически приемлемой соли.

В шестом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения изображения распределения соединения формулы (I)-(V) или его фармацевтически приемлемой соли, причем способ включает:

a) введение соединения субъекту и

b) визуализацию *in vivo* распределения соединения методом позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ).

В первом варианте выполнения шестого аспекта изображаемое распределение соединения формулы (I)-(V) или его фармацевтически приемлемой соли указывает на наличие или отсутствие заболевания.

В седьмом аспекте настоящее изобретение относится к способу мониторинга развития заболевания у субъекта, причем способ включает:

(a) введение субъекту, нуждающемуся в этом, соединения формулы (I)-(V) или его фармацевтически приемлемой соли, которое связывается с молекулой-мишенью, связанной с наличием заболевания, в первый момент времени, и получение изображения по меньшей мере части субъекта для определения количества пораженных заболеванием клеток или ткани; и

(b) введение субъекту соединения в одну или несколько последующих временных точек и получение изображения по меньшей мере части субъекта в каждый момент времени; где размер и местоположение пораженных заболеванием клеток или ткани в каждый момент времени указывает на развитие заболевания.

В восьмом аспекте настоящее изобретение относится к способу количественного определения пораженных заболеванием клеток или тканей у субъекта, причем способ включает:

(a) введение субъекту, имеющему пораженные клетки или ткани, соединения формулы (I)-(V) или его фармацевтически приемлемую соль, которое связывается с молекулой-мишенью, расположенной в пораженных заболеванием клетках или тканях; и

(b) обнаружение радиоактивных излучений  $^{18}\text{F}$  в пораженных клетках или ткани, где уровень и распределение радиоактивных излучений в пораженных клетках или тканях является количественной мерой пораженных клеток или тканей.

В первом варианте выполнения восьмого аспекта заболевание выбирается из группы, состоящей из солидных опухолей, гемопоэтических типов рака, гематологических типов рака, аутоиммунного заболевания, нейродегенеративного заболевания, сердечно-сосудистого заболевания и патогенной инфекции.

В девятом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения количественного изображения тканей или клеток, экспрессирующих PD-L1, причем способ включает приведение в контакт клеток или ткани с соединением формулы (I)-(V) или его фармацевтически приемлемой солью, которое связывается с PD-L1, и обнаружение или количественную оценку ткани, экспрессирующей PD-L1, осуществляются с использованием позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ).

В десятом аспекте настоящее изобретение относится к способу скрининга агента для лечения заболевания, включающему стадии:

(a) приведения в контакт клеток, экспрессирующих PD-L1, с соединением формулы (I)-(V) или его фармацевтически приемлемой солью, которое связывается с PD-L1 в присутствии и отсутствие агента-кандидата; и

(b) визуализации клеток в присутствии и отсутствие агента-кандидата с использованием позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ),

где уменьшение количества радиоактивных излучений в присутствии агента-кандидата указывает на то, что агент связывается с PD-L1.

В одиннадцатом аспекте настоящее изобретение относится к диагностическому агенту или фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль.

Согласно одному варианту выполнения любого из аспектов настоящего изобретения заболевание связано с уровнем и распределением в тканях и клетках экспрессируемого PD-L1. Как правило, заболевание выбирается из группы, состоящей из солидных опухолей, гемопэтических типов рака, гематологических типов рака, аутоиммунных заболеваний, нейродегенеративного заболевания, сердечно-сосудистого заболевания и патогенных заболеваний. В другом варианте выполнения изобретения заболевание представляет собой солидную опухоль.

Описанное в настоящем документе относится к  $^{18}\text{F}$ -простетическим группам и способам получения  $^{18}\text{F}$ -простетических групп. Также описанное в настоящем документе относится к композициям с радиометкой, содержащим  $^{18}\text{F}$ -простетические группы, и применению этих композиций с радиометкой для диагностики, локализации, мониторинга и/или оценки пораженных клеток и/или тканей и связанных с ними биологических условий.

Для того чтобы настоящее описание было более понятным, сначала даются определения для конкретных терминов. Дополнительные определения излагаются во всем подробном описании изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, какое обычно известно специалисту в данной области техники, и используются обычные методы масс-спектропии, ЯМР, ВЭЖХ, биохимии, методики рекомбинантной ДНК и фармакологии.

Используемые в настоящем документе формы единственного числа "a", "an" и "the" включают множественные значения, если контекст явно не диктует иное. Использование "или" или "и" означает "и/или", если не указано иное. Кроме того, использование термина "включая", а также других форм, таких как "включают", "включает" и "включая", не является ограничивающим.

Используемый в настоящем документе термин "около" означает в пределах плюс-минус десяти процентов от числа. Например, "около 100" относится к любому числу от 90 до 110.

Используемый в настоящем документе термин "медицинская визуализация" относится к способам и процессам, используемым для создания изображений тела субъекта (или его частей) в клинических целях (медицинские процедуры, направленные на выявление, диагностику или мониторинг заболевания) или для медицинской науки (включая изучение нормальной анатомии и физиологии).

Используемый в настоящем документе термин "позитронно-эмиссионная томография" или "ПЭТ" относится к неинвазивному способу радиационной медицины, который создает трехмерное изображение местоположения трассера в организме. Способом обнаруживают пары гамма-лучей, испускаемых косвенно излучающим позитрон радионуклидом (трассером), который вводится в организм на биологически активной молекуле. Инструменты ПЭТ-визуализации имеют широкий спектр применений и помогают в разработке лекарственных средств как доклинически, так и клинически. Типичные приложения включают прямую визуализацию насыщения мишеней *in vivo*; мониторинг потребления в нормальных тканях для прогнозирования токсичности или изменения от пациента к пациенту; количественное определение пораженной ткани; опухолевые метастазы и мониторинг эффективности лекарственного средства с течением времени или резистентности со временем.

Термин "биоортогональная химия" относится к любой химической реакции, которая может возникнуть внутри живых систем, не мешая природным биохимическим процессам. Термин включает химические реакции, которые являются химическими реакциями, которые происходят *in vitro* при физиологическом pH в воде или в присутствии воды. Чтобы считаться биоортогоном, реакции должны являться избирательными и избегать побочных реакций с другими функциональными группами, обнаруживаемыми в исходных соединениях. Кроме того, получаемая ковалентная связь между партнерами реакции должна быть сильной и химически инертной по отношению к биологическим реакциям и не должна влиять на биологическую активность целевой молекулы.

Термин "клик-химия" относится к набору заслуживающих доверия и селективных биоортогональных реакций для быстрого синтеза новых соединений и комбинаторных библиотек. Свойства клик-реакций включают модульность, широту охвата, высокий выход, стереоспецифичность и простоту выделения продукта (отделение от инертных побочных продуктов хроматографическими методами) для получения соединений, которые являются стабильными в физиологических условиях. В радиохимии и радиофармацевтике клик-химия представляет собой общий термин для набора реакций для пометки, которые обуславливают использование селективных и модульных строительных блоков и позволяют хемоселективным лигированиям наносить радиометку на биологически значимые соединения в отсутствие катализаторов. "Клик-реакция" может быть с медью или это может быть клик-реакция без использования меди.

Термин "простетическая группа" или "бифункциональный агент для пометки" относится к небольшой органической молекуле, содержащей радионуклид (например,  $^{18}\text{F}$ ), который способен связываться с мишленой молекулой.

Используемый в настоящем документе термин "мишень" в качестве общей ссылки на "биологическую мишень" относится к клетке, ткани (например, раку или опухоли), патогенному микроорганизму (например, бактерии, вирусу, грибку, растению, приону, простейшим или их частям) или другой молекуле, связанной с биологическим путем или биологическим явлением, таким как воспаление ткани, образо-

вание бляшек и т.д.

Термин "нацеливающий лиганд", "нацеливающий агент" или "нацеливающая молекула" используются взаимозаменяемо со ссылкой на молекулу, такую как пептид, миламолекула и т.д., которая связывается с другой молекулой. В конкретных вариантах выполнения изобретения нацеливающий агент связан с  $^{18}\text{F}$ -простетической группой для того, чтобы "нацеливать" молекулу, связанную с конкретной клеткой, тканью, патогеном или биологическим путем.

Термины "специфически связывается", "специфическое связывание", "селективное связывание" и "селективно связывается", как взаимозаменяемо используются в настоящем документе, относятся к пептиду или полипептиду, который проявляет аффинность к биологической мишени, но существенно не связывается (например, менее чем около 10% связывания) с другими молекулами, как измеряется с помощью методики, доступной в данной области техники, такой как, но без ограничения, анализ Скэтчарда и/или анализ конкурентного связывания (например, конкурентное ELISA, тест BIACORE).

Используемый в настоящем документе термин " $\text{IC}_{50}$ " относится к концентрации зонда на основе миламолекулы с радиометкой  $^{18}\text{F}$ , которая ингибирует ответ как в анализе *in vitro*, так и *in vivo*, до уровня, который составляет 50% от максимального ингибирующего ответа, т.е. до половины между максимальным ингибирующим ответом и необработанным ответом.

Используемый в настоящем документе термин "связанный" относится к ассоциации двух или более молекул. Связь может быть ковалентной или нековалентной.

Термины "диагностика" или "обнаружение" могут использоваться взаимозаменяемо. В то время как диагноз обычно относится к определению специфического гистологического статуса ткани, детектирование распознает и обнаруживает ткань, повреждение или организм, содержащий определенную обнаруживаемую мишень.

Термин "обнаруживаемый" относится к способности обнаруживать сигнал поверх фонового сигнала. Термин "детектируемый сигнал", используемый в настоящем документе в контексте агентов визуализации и диагностики, представляет собой сигнал, полученный от неинвазивных методик визуализации, таких как, но без ограничения, позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ). Детектируемый сигнал можно обнаружить и отличить от других фоновых сигналов, которые могут быть получены от субъекта. Другими словами, существует измеримое и статистически значимое различие (например, статистически значимое различие достаточно для различия детектируемого сигнала и фона, такое как около 0,1, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 или 40% или более разницы между детектируемым сигналом и фоном) между детектируемым сигналом и фоном. Для определения относительной интенсивности детектируемого сигнала и/или фона могут использоваться стандарты и/или калибровочные кривые.

"Эффективное количество для детектирования" композиции, содержащей визуализирующий агент, описанный в настоящем документе, определяется как количество, достаточное для получения приемлемого изображения с использованием оборудования, доступного для клинического применения. Эффективное количество для детектирования визуализирующего агента, предлагаемого в настоящем документе, может вводиться более чем в одной инъекции. Эффективное количество для детектирования может варьироваться в зависимости от таких факторов, таких как степень восприимчивости индивидуума, возраст, пол и вес индивидуума, идиосинкратические ответы индивидуума и тому подобного. Эффективные количества для детектирования композиций для визуализации могут также варьироваться в зависимости от используемого инструмента и методологий. Оптимизация таких факторов находится в пределах уровня развития в данной области техники.

Используемый в настоящем документе термин "введение", используемый в контексте визуализирующих агентов, относится к физическому введению композиции, содержащей визуализирующий агент, субъекту с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники. Предпочтительные пути введения визуализирующих агентов, описанных в настоящем документе, включают внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный, подкожный, спинномозговой или другой парентеральный путь введения, например путем инъекции или инфузии. Используемая в настоящем документе фраза "парентеральное введение" означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включает, без ограничения, внутривенную, внутрибрюшинную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интралимфатическую, внутричерепную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и внутригрудинную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. Альтернативно, визуализирующий агент, описанный в настоящем документе, можно вводить посредством непарентерального пути, такого как местный, эпидермальный или слизистый путь введения, например интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или топически. Введение также может выполняться, например, один раз, несколько раз и/или в течение одного или более длительных периодов.

Термины "совместное введение" или тому подобное, используемые в настоящем документе, предназначены для охвата введения выбранных фармацевтических агентов одному пациенту и предназначены для включения режимов, в которых агенты вводят одним и тем же или другим путем введения или в

одно и то же или разное время.

Термины "пациент" и "субъект" относятся к любому человеку или животному, не являющемуся человеком, которое получает композицию, содержащую визуализирующий агент, описанный в настоящем документе. Для применений *in vitro*, таких как диагностические и исследовательские применения *in vitro*, будут пригодны для использования биологические жидкости и образцы клеток вышеуказанных субъектов, например образцы крови, мочи или ткани.

Термин "образец" может относиться к образцу ткани, образцу клетки, образцу жидкости и тому подобному. Образец может быть взят у субъекта. Образец ткани может включать волосы (включая корни), буккальные мазки, кровь, слюну, сперму, мышцу или образец из любых внутренних органов. Жидкость может представлять собой, но без ограничения, мочу, кровь, асцит, плевральную жидкость, спинномозговую жидкость и тому подобное. Ткань тела может включать, но без ограничения, ткань кожи, мышцы, эндометрия, матки и шейки матки.

Термин "изотопно чистый" означает, что элемент, соединение или композиция содержат большую часть одного изотопа по отношению к другим изотопам. В конкретных вариантах выполнения изобретения элемент, соединение или композиция является более чем около 40, 50 или 60% изотопно чистым.

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

Группа "OTf" относится к трифлату, имеющему формулу  $CF_3SO_3$  или трифторметансульфату.

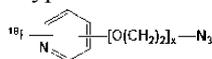
Термин "гало" или, альтернативно, "галоген" или "галид" означает фторо, хлоро, бромо или иодо.

В соответствии с описанием группы и их заместители могут быть выбраны специалистом в данной области для получения стабильных фрагментов и соединений и соединений, полезных в качестве фармацевтически приемлемых соединений, и/или промежуточных соединений, полезных для получения фармацевтически приемлемых соединений.

Различные аспекты, описанные в настоящем документе, описаны более подробно в следующих подразделах.

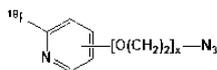
Простетические группы с радиометкой  $^{18}F$ .

В одном аспекте заявленное изобретение представляет собой ПЭГилированный  $^{18}F$ -пиридин, ковалентно связанный с азидом следующей структуры



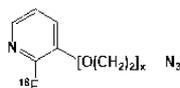
или его фармацевтически приемлемую соль, где  $x$  представляет собой целое число от 1 до 8. В некоторых вариантах выполнения изобретения  $x$  представляет собой целое число от 2 до 6. В некоторых вариантах выполнения изобретения  $x$  представляет собой целое число от 3 до 5. В некоторых вариантах выполнения изобретения  $x$  равно 4. В соответствующих вариантах выполнения изобретения  $^{18}F$  присоединен к пиридину в положении орто по отношению к атому N. В некоторых вариантах выполнения изобретения фрагмент  $[O(CH_2)_2]_x$  присутствует в конфигурации 1-3 по отношению к азоту на пиридиновом кольце. В некоторых вариантах выполнения изобретения фрагмент  $[O(CH_2)_2]_x$  присутствует в конфигурации 1-2 по отношению к азоту на пиридиновом кольце. В других вариантах выполнения изобретения фрагмент  $[O(CH_2)_2]_x$  присутствует в конфигурации 1-4 по отношению к азоту на пиридиновом кольце.

В некоторых вариантах выполнения изобретения соединение с радиометкой  $^{18}F$  имеет структуру



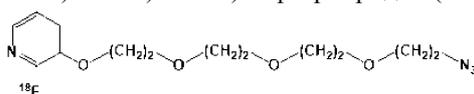
или его фармацевтически приемлемая соль, где  $x$  представляет собой целое число от 1 до 8. В некоторых вариантах выполнения изобретения  $x$  представляет собой целое число от 2 до 6. В некоторых вариантах выполнения изобретения  $x$  представляет собой целое число от 3 до 5. В некоторых вариантах выполнения изобретения  $x$  равно 4. В некоторых вариантах выполнения изобретения фрагмент  $[O(CH_2)_2]_x$  присутствует в конфигурации 1-3 по отношению к азоту на пиридиновом кольце. В некоторых вариантах выполнения изобретения фрагмент  $[O(CH_2)_2]_x$  присутствует в конфигурации 1-2 по отношению к азоту на пиридиновом кольце. В других вариантах выполнения изобретения фрагмент  $[O(CH_2)_2]_x$  присутствует в конфигурации 1-4 по отношению к азоту на пиридиновом кольце.

В некоторых вариантах выполнения изобретения соединение с радиометкой  $^{18}F$  имеет структуру



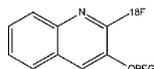
где  $x$  представляет собой целое число от 1 до 8. В некоторых вариантах выполнения изобретения  $x$  представляет собой целое число от 2 до 6. В некоторых вариантах выполнения изобретения  $x$  представляет собой целое число от 3 до 5. В некоторых вариантах выполнения изобретения  $x$  равно 4.

В некоторых вариантах выполнения изобретения соединение с радиометкой  $^{18}\text{F}$  представляет собой  $[^{18}\text{F}]\text{-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокс)этокс)этокс)этокс)этокс)-2-фторпиридин}$  ( $^{18}\text{F}\text{-FPPEGA}$ ) и имеет структуру



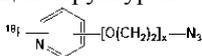
В альтернативных вариантах выполнения изобретения простетическая группа с радиометкой  $^{18}\text{F}$  может содержать дополнительные группы на пиридиновом кольце, которые не влияют на реакцию фторирования. В конкретных вариантах выполнения изобретения добавления к пиридиновому кольцу включают  $\text{C}_{1-6}$  алкильные группы, например метил, этил и пропил.

В еще других вариантах выполнения изобретения простетическая группа с радиометкой  $^{18}\text{F}$  представляет собой конденсированную кольцевую систему со следующей структурой:



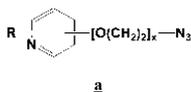
где "OPEG" представляет собой  $[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_x$ , а  $x$  представляет собой целое число от 1 до 8. В некоторых вариантах выполнения изобретения  $x$  представляет собой целое число от 2 до 6. В некоторых вариантах выполнения изобретения  $x$  представляет собой целое число от 3 до 5. В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

В связанном аспекте изобретение относится к способу получения ПЭГилированного  $^{18}\text{F}$ -пиридина, ковалентно связанного с азидом, со следующей структурой



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

(a) предоставление раствора соединения a со следующей структурой:



a

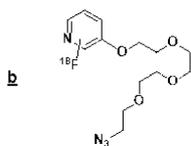
где  $x$  представляет собой целое число от 1 до 8, а R представляет собой  $\text{NO}_2$ , Br, F или и находится в орто-положении по отношению к атому N пиридинового кольца;

(b) предоставление смеси  $^{18}\text{F}$  в  $^{18}\text{O}$ воде, 4,7,13,16,21,24-гексаокса-1,10-диазабицикло[8.8.8]гексакозана и слабого основания;

(c) высушивание смеси со стадии (b) с образованием твердого вещества; и

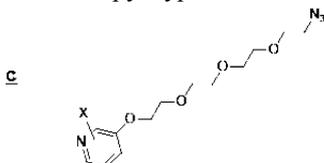
(d) взаимодействие раствора со стадии (a) с твердым веществом со стадии (c) с образованием соединения с меткой  $^{18}\text{F}$ .

В конкретных вариантах выполнения изобретения способом получают  $^{18}\text{F}$ -пиридиновую простетическую группу со следующей структурой b

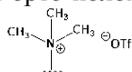


(где  $^{18}\text{F}$  находится в орто-положении по отношению к атому N), и способ включает стадии:

(a) предоставление раствора соединения структуры



(где X находится в орто-положении по отношению к атому N), где X представляет



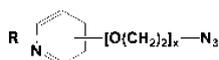
собой  $\text{NO}_2$ , Br или

(b) предоставление смеси  $^{18}\text{F}$  в  $^{18}\text{O}$ воде, 4,7,13,16,21,24-гексаокса-1,10-диазабицикло[8.8.8]гексакозана и слабого основания, такого как  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ;

(c) высушивание смеси со стадии (b) с образованием твердого вещества; и

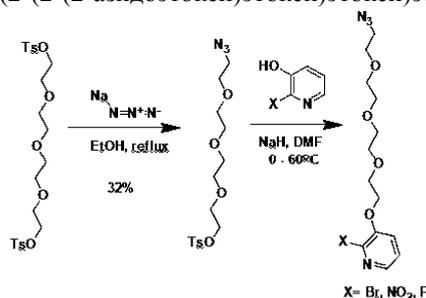
(d) взаимодействие раствора со стадии (a) с твердым веществом со стадии (c) с образованием соединения с меткой  $^{18}\text{F}$ .

В конкретных вариантах выполнения изобретения способом дополнительно включает стадию получения соединения со следующей структурой a:

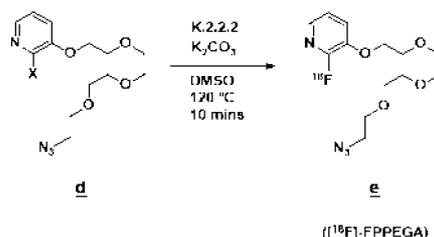


в соответствии со схемой I, показанной ниже:

В конкретных вариантах выполнения изобретения способ включает получение  $^{18}\text{F}$ -пиридиновой простетической группы [ $^{18}\text{F}$ ]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина



( $^{18}\text{F}$ -FPPEGA), e, из d в соответствии со следующими условиями реакции:



#### Составы.

Кроме того, изобретение относится к композициям, например фармацевтическим композициям, содержащим один или комбинацию нацеливающих агентов с меткой  $^{18}\text{F}$ , описанных в настоящем документе, вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут включать один или комбинацию (например, двух или более разных) агентов, описанных в настоящем документе. Например, описанная в настоящем документе фармацевтическая композиция может содержать комбинацию нацеливающего агента с меткой  $^{18}\text{F}$  и лекарственного средства.

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно носитель пригоден для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). В зависимости от пути введения нацеливающий агент с меткой  $^{18}\text{F}$  может быть покрыт материалом для защиты соединения от действия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать соединение.

Фармацевтические соединения, описанные в настоящем документе, могут включать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. "Фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет требуемую биологическую активность исходного соединения и не оказывает нежелательного токсического действия (см., например, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Примеры таких солей включают соли присоединения кислот и соли присоединения оснований. Кислотно-аддитивные соли включают соли, полученные из нетоксичных неорганических кислот, таких как хлороводородная, азотная, фосфорная, серная, бромоводородная, иодоводородная, фосфористая и тому подобных, а также из нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксилкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфокислоты и тому подобное. Основно-аддитивные соли включают соли, полученные из щелочноземельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и тому подобных, а также из нетоксичных органических аминов, таких как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и тому подобных.

Фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, также может включать фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и тому подобные; (2) растворимые в масле антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилгидроксианизол (БНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и тому подобные; и (3) хелатирующие металл агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и тому подобные.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут быть использованы в описан-

ных в настоящем документе фармацевтических композициях, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и тому подобные) и подходящие их смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Требуемая текучесть может поддерживаться, например, путем использования покрывающих материалов, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем использования поверхностно-активных веществ.

Эти композиции могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Предотвращение присутствия микроорганизмов может быть обеспечено как процедурами стерилизации, *surgra*, так и включением различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и тому подобных. Кроме того, может быть желательно включать в композиции изотонические агенты, такие как сахара, хлорид натрия и тому подобные. Кроме того, пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть осуществлена путем включения в композицию агентов, которые задерживают абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсии. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области техники. За исключением тех случаев, когда обычные среды или агент несовместимы с активным соединением, их применение в фармацевтических композициях возможно. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Фармацевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композицию можно составить в форме раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное) и подходящими их смесями. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть осуществлена путем включения в композицию агента, который задерживает абсорбцию, например моностеаратных солей и желатина.

Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения нацеливающего агента с меткой  $^{18}\text{F}$  в требуемом количестве в подходящем растворителе с использованием одного или комбинации ингредиентов, перечисленных выше, с последующей стерилизационной микрофильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и сушка вымораживанием (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный требуемый ингредиент из предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

Количество нацеливающего агента с меткой  $^{18}\text{F}$ , который можно комбинировать с материалом-носителем для получения единичной дозированной формы, будет варьироваться в зависимости от субъекта, подвергаемого лечению, и конкретного способа введения. Количество нацеливающего агента с меткой  $^{18}\text{F}$ , который может быть объединен с материалом-носителем для получения единичной дозированной формы, обычно будет таким количеством композиции, которое создает детектируемый эффект. Как правило, из 100% это количество будет составлять от около 0,01 до около 99% активного ингредиента, предпочтительно от около 0,1 до около 70%, наиболее предпочтительно от около 1 до около 30% активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

#### Введение и визуализация.

Описанные в настоящем документе нацеливающие агенты с меткой  $^{18}\text{F}$  могут быть использованы во множестве приложений визуализации *in vivo* (например, для визуализации ткани или всего тела). В конкретных вариантах выполнения изобретения нацеливающий агент с меткой  $^{18}\text{F}$  может быть использован для визуализации положительных целевых клеток или тканей, например целевых экспрессирующих опухолей. Например, нацеливающий агент с меткой  $^{18}\text{F}$  вводят субъекту в количестве, достаточном для поглощения нацеливающего агента с меткой  $^{18}\text{F}$  в интересующую ткань. Затем объект визуализируется с применением системы формирования изображения, такой как ПЭТ, в течение времени, подходящего для радионуклида  $^{18}\text{F}$ . Нацеливающий агент с меткой  $^{18}\text{F}$ , связанный с клетками или тканями, экспрессирующими нацеливающий агент, затем детектируется системой визуализации.

Как правило, для целей визуализации желательно предоставить реципиенту дозу миллимолекулы, которая находится в диапазоне от около 1 до около 200 мг в виде однократной внутривенной инфузии, хотя также можно вводить более низкую или более высокую дозу в зависимости от обстоятельств.

Обычно желательно, чтобы реципиент получал дозу, которая находится в диапазоне от около 1 до около 10 мг на квадратный метр площади поверхности тела белка или пептида для типичного взрослого человека, хотя также можно вводить более низкую или более высокую дозу в зависимости от обстоятельств. Примеры дозировок белков или пептидов, которые могут быть введены человеку для целей визуализации, составляют от около 1 до около 200 мг, от около 1 до около 70 мг, от около 1 до около 20 мг и от около 1 до около 10 мг, хотя могут применяться более высокие или более низкие дозы.

В конкретных вариантах выполнения изобретения введение происходит в количестве миллимолекулы с радиометкой  $^{18}\text{F}$  от около 0,005 до около 50 мкг/кг массы тела в день, обычно от 0,02 до около 3 мкг/кг массы тела. Масса, связанная с ПЭТ-трассером, находится в форме природного изотопа, а именно  $^{19}\text{F}$  для ПЭТ-трассера  $^{18}\text{F}$ . Конкретная аналитическая доза для композиции с немедленным высвобождением включает от около 0,5 до около 100 мкг миллимолекулы с радиометкой  $^{18}\text{F}$ . Доза обычно будет составлять от около 1 до около 50 мкг миллимолекулы с радиометкой  $^{18}\text{F}$ .

Режимы дозирования регулируют таким образом, чтобы обеспечить оптимальное обнаруживаемое количество для получения четкого изображения ткани или клеток, которые поглощают нацеливающий агент с меткой  $^{18}\text{F}$ . Особенно предпочтительно составлять парентеральные композиции в дозированной единичной форме для простоты введения и однородности дозы. Дозированная единичная форма, как используется в настоящем документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве унифицированных доз для субъектов, которым должен быть назначен нацеливающий агент с меткой  $^{18}\text{F}$ . Спецификация для дозированных единичных форм, описанных в настоящем документе, продиктована и непосредственно зависит от (а) уникальных характеристик нацеливающей части нацеливающего агента с меткой  $^{18}\text{F}$ ; (б) ткани или клетки, подлежащих таргетированию; (с) ограничений, присущих используемой технологии визуализации.

Для введения нацеливающего агента, меченного  $^{18}\text{F}$ , применяемая дозировка будет зависеть от типа заболевания, используемого нацеливающего соединения, возраста, физического состояния и пола субъекта, стадии заболевания, исследуемого участка и другого. В частности, необходимо проявлять достаточную осторожность в отношении доз облучения субъекта. Предпочтительно пациенту вводится насыщающая доза  $^{18}\text{F}$ . Например, количество радиоактивности нацеливающего агента с меткой  $^{18}\text{F}$  обычно составляет от 3,7 до 3,7 Гбк и предпочтительно от 18 до 740 Мбк. Альтернативно, дозировка может быть измерена, например, в милликюри. В некоторых вариантах выполнения изобретения количество визуализации  $^{18}\text{F}$ , вводимой для исследований визуализации, составляет от 5 до 10 мКи. В других вариантах выполнения изобретения эффективным количеством будет количество соединения, достаточное для получения излучений в диапазоне от около 1 до около 5 мКи.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в описанных в настоящем документе фармацевтических композициях могут варьироваться таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого поглощения нацеливающего агента с меткой  $^{18}\text{F}$  в клетках или тканях конкретного пациента, композиции и способе введения, не являясь токсичными для пациента. Следует понимать, однако, что общее ежедневное использование нацеливающего агента с меткой  $^{18}\text{F}$  по настоящему изобретению будет определяться лечащим врачом или другим профессионалом в рамках обоснованного медицинского заключения. Конкретный уровень эффективной дозы для любого конкретного субъекта будет зависеть от множества факторов, включая, например, активность конкретной применяемой композиции; конкретную применяемую композицию; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и рацион питания хозяина; время введения; путь введения; скорость выделения конкретного применяемого соединения; продолжительность лечения; другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, применяемые в комбинации с конкретными применяемыми композициями, возраст, пол, вес, состояние, общее состояние здоровья и предысторию болезни пациента, подвергаемого лечению, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины. В конкретных вариантах выполнения изобретения количество зонда с радиометкой  $^{18}\text{F}$ , вводимого человеку, для которого требуется визуализация, будет определяться назначающим врачом с дозировкой, обычно изменяющейся в зависимости от количества излучения из радионуклида  $^{18}\text{F}$ .

Композицию, описанную в настоящем документе, можно вводить одним или несколькими путями введения с использованием одного или нескольких из множества способов, известных в данной области техники. Как будет понятно специалисту в данной области техники, путь и/или способ введения будут изменяться в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительные пути введения нацеливающих агентов с меткой  $^{18}\text{F}$ , описанных в настоящем документе, включают внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например путем инъекции или инфузии. Используемая в настоящем документе фраза "парентеральное введение" означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включает, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интраклеточную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субаракноидальную, интраспинальную, эпидуральную и внутригрудную инъекцию и инфузию. В конкретных вариантах выполнения изобретения нацеливающее соединение с радиометкой  $^{18}\text{F}$  вводят внутривенно.

Альтернативно, нацеливающий агент с меткой  $^{18}\text{F}$ , описанный в настоящем документе, можно вводить посредством непарентерального пути, такого как местный, эпидермальный или слизистый путь введения, например интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или топически.

В конкретных вариантах выполнения изобретения описанный в настоящем документе нацеливающий агент с меткой  $^{18}\text{F}$  может быть составлен для обеспечения правильного распределения *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) исключает многие высокогидрофильные соединения. Агенты могут пересекать BBB при составлении их, например, в липосомах. Способы изготовления липосом см., например, в патентах США №№ 4522811, 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать один или несколько фрагментов, которые избирательно переносятся в определенные клетки или органы, тем самым повышая нацеленную доставку лекарственного средства (см., например, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Типичные нацеливающие фрагменты включают фолат или биотин (см., например, патент США № 5416016 Low et al.); маннозиды (Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); антитела (P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); рецептор поверхностно-активного белка А (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); смотри также K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994).

Следующая иллюстративная процедура может быть использована при проведении исследований ПЭТ-визуализации на пациентах в клинике. Пациенту проводят премедикацию немеченой миллимолекулой в течение некоторого времени до дня эксперимента и он голодает в течение по меньшей мере 12 ч при потреблении воды *ad libitum*. В контралатеральную локтевую вену вводят 20 G двухдюймовый венозный катетер для введения концентрации радиотрассера в кровь.

Пациента помещают в ПЭТ-камеру и через внутривенный катетер вводят индикаторную дозу ПЭТ-трассера из миллимолекулы с меткой  $^{18}\text{F}$  (<20 мКи). Либо образцы артериальной, либо венозной крови берут с соответствующими интервалами времени в течение всего ПЭТ-сканирования для того, чтобы анализировать и количественно определять фракцию неметаболизированного ПЭТ-трассера соединения [ $^{18}\text{F}$ ] примера 2 в плазме. Изображения получают в течение вплоть до 120 мин. В течение 10 мин после инъекции радиотрассера и в конце сеанса визуализации получают 1 мл образцов крови для определения концентрации в плазме любой немеченой миллимолекулы, которая могла быть введена перед до ПЭТ-трассера.

Томографические изображения получают путем реконструкции изображений. Для определения распределения радиотрассера интересующие области (ROI) рисуют на реконструированном изображении, включая, но без ограничения, легкие, печень, сердце, почку, кожу или другие органы и ткань. Поглощения радиотрассера в течении времени в этих областях используются для генерирования кривых активности во времени (ТАС), полученных в отсутствие какого-либо вмешательства или в присутствии немеченой миллимолекулы при различных исследуемых парадигмах дозирования. Данные выражаются как радиоактивность в единицу времени на единицу объема (мКи/сс/мКи введенная доза). Данные ТАС обрабатываются различными методами, хорошо известными в данной области, с получением количественных параметров, таких как Связывающая Способность (BP) или Объем Распределения ( $V_T$ ), которые пропорциональны плотности незанятой целевой положительной ткани.

Наборы и изделия производства.

Изобретение также относится к наборам для получения описанных в настоящем документе нацеливающих композиций с радиометкой  $^{18}\text{F}$  и инструкциям по применению. Наборы обычно содержат упакованную комбинацию реагентов в заранее определенных количествах с инструкциями и надписью, указывающей предполагаемое применение содержимого набора. Термин "надпись" означает любую запись или записанный материал, нанесенный на набор или поставляемый с набором, или которые другим образом прилагаются к набору.

Например, в некоторых вариантах выполнения изобретения набор содержит реагенты, необходимые для получения протетической группы при фторировании  $^{18}\text{F}$  на месте, а затем связывания радиоактивно меченой протетической группы с нацеливающей молекулой (например, миллимолекулой) до введения.

В конкретных вариантах выполнения изобретения набор содержит один или несколько реагентов, необходимых для образования визуализирующего агента анти-PD-L1 миллимолекулы с меткой  $^{18}\text{F}$  *in vivo*, такого как описанный в настоящем документе. Например, набор может содержать первый флакон, содержащий миллимолекулу против PD-L1, и второй флакон, содержащий [ $^{18}\text{F}$ ]FPPEGA. Набор может содержать первый флакон, содержащий миллимолекулу против PD-L1, второй флакон, содержащий 4-ПЭГ-тозилатид, и третий флакон, содержащий  $^{18}\text{F}$  в  $^{18}\text{O}$ воде. Наборы могут дополнительно содержать флаконы, растворы и необязательно дополнительные реагенты, необходимые для изготовления PD-L1 миллимолекулы-PEG4-DBCO- $^{18}\text{F}$ .

В некоторых вариантах выполнения изобретения набор может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный реагент (например, фармацевтически приемлемый носитель). В некоторых вариантах выполнения изобретения набор содержит прекурсоры реакции, которые должны использоваться для получения меченого зонда в соответствии с описанными в настоящем документе способами.

Компоненты набора могут быть адаптированы к конкретному биологическому состоянию, подлежащему мониторингу, как описано в настоящем документе. Набор может дополнительно содержать соответствующие буферы и реагенты, известные в данной области для введения различных комбинаций компонентов, перечисленных выше, в клетку-хозяина или организм-хозяин. Визуализирующий агент и носитель могут находиться в форме раствора или в лиофилизированной форме. Когда агент для визуализации и носитель из набора находятся в лиофилизированной форме, набор может необязательно содержать стерильную и физиологически приемлемую среду для восстановления, такую как вода, физиологический раствор, забуференный физиологический раствор и тому подобное. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и пробирки. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Он может также включать другие материалы, пригодные с коммерческой и пользовательской точек зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и листки-вкладыши с инструкциями по применению.

#### Применения.

Изобретение относится к способам получения изображений с использованием нацеливающих агентов с меткой  $^{18}\text{F}$ . Трассеры позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), такие как заявленные ПЭТ-зонды на основе миламолекулы с радиометкой  $^{18}\text{F}$ , могут использоваться с существующей в настоящее время технологией ПЭТ для применения в исследовательских и диагностических приложениях визуализации *in vitro* и *in vivo*. Методики визуализации и оборудование для визуализации  $^{18}\text{F}$  с помощью ПЭТ-сканирования хорошо известны в данной области техники (см., например, патенты США №№ 6358489; 6953567; Page et al., Nuclear Medicine And Biology, 21:911-919, 1994; Choi et al., Cancer Research 55:5323-5329, 1995; Zalutsky et al., J. Nuclear Med., 33:575-582, 1992), и любая такая известная методика ПЭТ-визуализации или устройство могут быть использованы.

Применения способов визуализации *in vivo*, представленных в настоящем документе, включают диагностику заболевания, мониторинг развития заболевания, прогноз, определение вероятности ответа субъекта на лечение, определение приемлемости лечения, мониторинг клинического ответа на терапию, клиническую оценку и выбор дозы терапевтических соединений, доклинические исследования потенциальных кандидатов в лекарственные средства на моделях животных и изучение регионального распределения и концентрации молекул-мишеней в тканях и органах. Применения *in vitro* включают скрининг кандидатов в лекарственные средства в клеточных анализах (например, анализах конкуренции, анализах аффинности и т.д.).

В некоторых вариантах выполнения изобретения нацеливающие агенты с меткой  $^{18}\text{F}$  могут быть использованы для определения взаимосвязи между уровнем заполнения ткани терапевтическими соединениями-кандидатами и клинической эффективностью у пациентов; для определения выбора дозы для клинических исследований кандидатов в лекарственные средства до начала длительных клинических исследований и для сравнения потенциалов различных кандидатов в лекарственные средства.

В некоторых вариантах выполнения изобретения нацеливающее соединение с радиометкой  $^{18}\text{F}$  используют в способе визуализации нормальных или пораженных тканей и/или органов *in vivo* (например, легких, сердца, почек, печени и кожи). Например, нацеливающее соединение с радиометкой  $^{18}\text{F}$  вводят субъекту в количестве, эффективном для того, чтобы привести к поглощению нацеливающего соединения с радиометкой  $^{18}\text{F}$  интересующей клеткой или тканью. Затем субъект вводится в подходящую систему формирования изображения (например, ПЭТ-систему) в течение достаточного количества времени для того, чтобы обеспечить детектирование нацеливающего соединения с радиометкой  $^{18}\text{F}$ . Расположение обнаруженного сигнала из нацеливающего соединения с радиометкой  $^{18}\text{F}$  может быть сопоставлено с расположением интересующих клеток или ткани. В некоторых вариантах выполнения изобретения также могут быть определены размеры местоположения. В настоящем документе описывается визуализация *in vivo* (см. также патенты США №№ 6126916; 6077499; 6010680; 5776095; 5776094; 5776093; 5772981; 5753206; 5746996; 5697902; 5328679; 5128119; 5101827 и 4735210, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки).

Соответственно в конкретных аспектах изобретение относится к способу получения изображения зонда на основе миламолекулы с радиометкой  $^{18}\text{F}$ , причем способ включает введение субъекту зонда на основе миламолекулы с радиометкой  $^{18}\text{F}$  и визуализацию *in vivo* распределения зонда на основе миламолекулы с радиометкой  $^{18}\text{F}$  с помощью ПЭТ.

В конкретных вариантах выполнения изобретения субъект представляет собой млекопитающее, например человека, собаку, кошку, человекообразную обезьяну, обезьяну, крысу или мышь.

В конкретных аспектах изобретение относится к способу диагностики наличия заболевания у субъекта, причем способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, зонда на основе миламолекулы с радиометкой  $^{18}\text{F}$ , который связывается с молекулой-мишенью, ассоциированной с наличием заболевания, и получение радиоизображения по меньшей мере части субъекта для обнаружения присутствия или отсутствия зонда на основе миламолекулы с радиометкой  $^{18}\text{F}$ .

В некоторых вариантах выполнения изобретения заболевание представляет собой солидный рак, гемопозитический рак, гематологический рак, аутоиммунное заболевание, нейродегенеративное заболевание, сердечно-сосудистое заболевание или патогенную инфекцию.

ПЭТ-визуализацию нацеливающего соединения с радиометкой  $^{18}\text{F}$  можно использовать для качественного или количественного определения нацеливающего соединения. В качестве биомаркера может быть использован визуализирующий агент нацеливающее соединение с радиометкой  $^{18}\text{F}$ , а наличие или отсутствие положительного сигнала у субъекта может служить индикатором, что, например, субъект будет реагировать на данную терапию, например терапию рака, или что субъект реагирует или нет на терапию.

В некоторых вариантах выполнения изобретения стадии этого способа могут быть повторены через определенные интервалы, чтобы можно было контролировать местоположение и/или размер заболевания в зависимости от времени и/или лечения. В конкретных вариантах выполнения изобретения нацеливающее соединение с радиометкой  $^{18}\text{F}$  может применяться у субъекта, подвергающегося лечению (например, химиотерапии и т.д.) для того, чтобы помочь визуализировать ответ на лечение. Например, нацеливающее соединение с радиометкой  $^{18}\text{F}$ , как правило, визуализируется и измеряется до лечения и периодически (например, ежедневно, еженедельно, ежемесячно, в интервалах между ними и тому подобное) во время лечения для того, чтобы наблюдать развитие или регресс заболевания у пациента.

Соответственно в конкретных аспектах изобретение относится к способу мониторинга прогрессирования заболевания у субъекта, который в этом нуждается, причем способ включает введение субъекту зонда на основе милламоллекулы с радиометкой  $^{18}\text{F}$ , который связывается с молекулой-мишенью, ассоциированной с присутствием заболевания, в первый момент времени и получение изображения по меньшей мере части субъекта для определения количества пораженных клеток или ткани, и введение субъекту зонда на основе милламоллекулы с радиометкой  $^{18}\text{F}$  в одну или нескольких последующих временных точек и получение изображения по меньшей мере части субъекта в каждый последующий момент времени (например, той же самой части, что и в первую точку времени).

В конкретных вариантах выполнения изобретения размер опухоли может мониториться у субъекта, проходящего противораковую терапию (например, химиотерапию, лучевую терапию), и степень регрессии опухоли может мониториться в реальном времени на основе детектирования нацеливания с радиометкой  $^{18}\text{F}$  на опухоль.

В некоторых вариантах выполнения изобретения способы по настоящему документу используются для оценки реакции пациента на терапию. В некоторых вариантах выполнения изобретения способы используются для выбора или изменения дозировки терапевтических соединений. В некоторых вариантах выполнения изобретения способы используются для наблюдения за поглощением нацеливающего соединения с радиометкой  $^{18}\text{F}$  в нормальных тканях для анализа токсичности или изменения от пациента к пациенту. В некоторых вариантах выполнения изобретения способы используются для наблюдения за эффективностью лекарственного средства или для обнаружения лекарственной устойчивости.

В некоторых вариантах выполнения изобретения радиоактивно меченые соединения вводят млекопитающим, предпочтительно людям, в фармацевтической композиции либо отдельно, либо в сочетании с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями в соответствии со стандартной фармацевтической практикой. Такие композиции можно вводить перорально или парентерально, включая внутривенные, внутримышечные, внутримышечные, внутримышечные, подкожные, ректальные и местные пути введения. В конкретных вариантах выполнения изобретения введение является внутривенным. В конкретных вариантах выполнения изобретения радиоактивно меченое соединение вводят путем внутривенной инъекции за менее чем один час после синтеза.

В некоторых вариантах выполнения изобретения биологическая активность *in vivo* нацеливающего агента с радиометкой  $^{18}\text{F}$  может быть измерена с точки зрения влияния на орган с помощью исследований биораспределения и динамических исследований ПЭТ-визуализации на мелких животных на соответствующей модели животных. Например, для исследований биораспределения группе животных вводится нацеливающий агент с радиометкой  $^{18}\text{F}$ , и подмножества животных умерщвляются одновременно или через некоторые временные интервалы (например, 5, 10, 30, 60 мин, 2 ч). Интересующие органы и ткани быстро вырезаются и взвешиваются, и определяется радиоактивность. Накопленная радиоактивность в органах и отдельных тканях рассчитывается как процент введенной дозы (%ID).

В некоторых вариантах выполнения изобретения нацеливающий агент с радиометкой  $^{18}\text{F}$ , представленный в настоящем документе, используют *in vitro* в качестве инструмента для скрининга для отбора соединений для применения в лечении тканей или клеток. Например, в некоторых вариантах выполнения изобретения пораженные клетки инкубируют с нацеливающим соединением с радиометкой  $^{18}\text{F}$  во время или после воздействия одного или нескольких лекарств-кандидатов. Способность кандидата в лекарственные средства влиять на заболевание может быть отображена с течением времени с использованием нацеливающего соединения с радиометкой  $^{18}\text{F}$ .

Например, целостность биологической активности нацеливающего агента с радиометкой  $^{18}\text{F}$  *in vitro* с точки зрения специфического связывания с выбранной молекулой-мишенью и поглощения радиоактивно меченой композиции оценивается на клеточной линии, экспрессирующей молекулу-мишень. Для анализов связывания и клеточной ассоциации клетки инкубируют при 4 или 37°C в течение подходящего времени с нацеливающей композицией с радиометкой  $^{18}\text{F}$ . Неспецифическое связывание определяют добавлением избытка немеченого нацеливающего агента. Степень специфического связывания расчи-

тывается путем вычитания неспецифического связывания из общего связывания. Поглощение выражается в процентах от общей добавленной дозы нацеливающего агента к клеткам на микрограмм белка (%ID/мкг клеточного белка).

В связанном аспекте настоящее изобретение относится к диагностической или радиофармацевтической композиции для *in vivo* или *in vitro*, которая содержит зонд на основе метки в виде миламолекулы с радиометкой  $^{18}\text{F}$  и фармацевтически приемлемый носитель.

Включение посредством ссылки.

Все документы и ссылки, в том числе патентные документы и веб-сайты, раскрытые в настоящем документе, индивидуально включаются посредством ссылки в этот документ в той же степени, как если бы они были полностью или частично написаны в этом документе.

Далее изобретение описано со ссылкой на следующие примеры, которые являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Хотя изобретение было описано подробно и со ссылкой на его конкретные варианты выполнения, специалисту в данной области техники будет очевидно, что в него могут быть внесены различные изменения и модификации без отхода от его сущности и объема.

Условие анализа А.

Колонка: Waters ВЕН С18, 2,0×50 мм, частицы 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетатом аммония; температура: 50°C; градиент: 0% В, 0-100% В через 3 мин, затем 0,5-минутное выдерживание при 100% В; поток: 1 мл/мин; обнаружение: УФ при 220 нм.

Условие анализа В.

Колонка: Waters ВЕН С18, 2,0×50 мм, частицы 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ ацетатом аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ ацетатом аммония; температура: 50°C; градиент: 0% В, 0-100% В через 3 мин, затем 0,5-минутное выдерживание при 100% В; поток: 0,5 мл/мин; обнаружение: УФ при 220 нм.

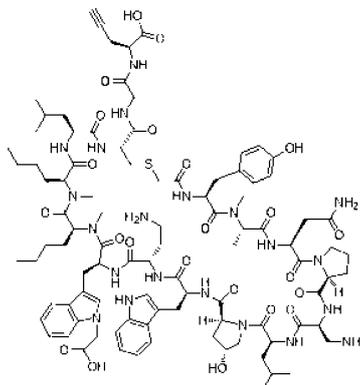
Процедура с одиночным связыванием.

В реакционную емкость, содержащую смолу с предыдущей стадии, добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин и затем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин и затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно пять раз следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (4,0 мл) через верхнюю часть сосуда и полученную смесь периодически перемешивали в течение 60 с, прежде чем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 5,0 мл, 10 экв.), затем НАТУ или НСТУ (0,2 М в DMF, 5,0 мл, 10 экв.) и, наконец, NMM (0,8 М в DMF, 2,5 мл, 20 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 60 мин, затем реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно четыре раза следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (4,0 мл) через верх сосуда и полученную смесь периодически перемешивали в течение 30 с, прежде чем раствор сливали через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор уксусного ангидрида: DIEA:DMF (10:1:89 об./об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно четыре раза следующим образом: для каждой промывки добавляли DMF (4,0 мл) через верхнюю часть сосуда и полученную смесь периодически перемешивали в течение 90 с, прежде чем раствор сливали через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Процедура с двойным связыванием.

В реакционный сосуд, содержащий смолу с предыдущей стадии, добавляли раствор пиперидина:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 мин и затем раствор сливали через фритту. К реакционному сосуду добавляли раствор пиперидина:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 мин и затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: промывали DMF (7 мл) сверху, затем промывали DMF (7 мл) снизу и, наконец, промывали DMF (7 мл) сверху. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 2,5 мл, 5 экв.), НАТУ (0,5 М в DMF, 1,0 мл, 5 экв.) и DIPEA (2М в NMP, 0,5 мл, 10 экв.). Смесь перемешивали путем барботирования  $\text{N}_2$  в течение 5 мин при 75°C для всех аминокислот, за исключением Fmoc-Cys(Trt)-ОН и Fmoc-His(Trt)-ОН, которые связываются при 50°C, реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: DMF (7 мл) промывали сверху, затем промывали DMF (7 мл) из нижней части и, наконец, промывали DMF (7 мл) сверху. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 2,5 мл, 5 экв.), НАТУ (0,5 М в DMF, 1,0 мл, 5 экв.) и DIPEA (2 М в NMP, 0,5 мл, 10 экв.). Смесь перемешивали путем барботирования  $\text{N}_2$  в течение 5 мин при 75°C для всех аминокислот, за исключением Fmoc-Cys(Trt)-ОН и Fmoc-His(Trt)-ОН, которые связываются при 50°C, реакционный раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: промывали DMF (7 мл) сверху, затем промывали DMF (7 мл) снизу и, наконец, промывали DMF (7 мл) сверху. В реакционный сосуд добавляли раствор

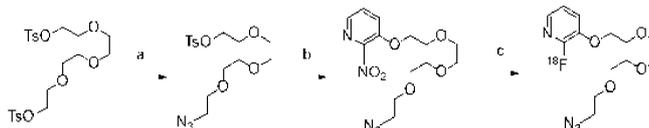
уксусного ангидрида: DIEA:DMF (10:1:89 об./об./об., 5,0 мл). Смесь периодически барботировали в течение 2 мин при 65°C, затем раствор сливали через фритту. Смолу промывали последовательно три раза следующим образом: промывали DMF (7 мл) сверху, затем промывали DMF (7 мл) снизу и, наконец, промывали DMF (7 мл) сверху. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии:



ИНТЕРМЕДИАТ 1300V

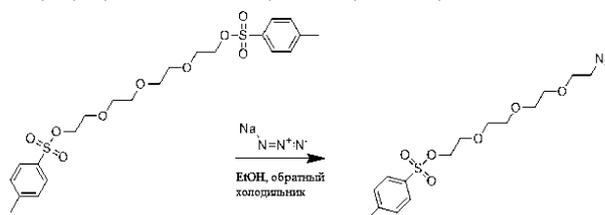
Следующий пептид синтезировали на 0,1 ммоль. На подчеркнутых стадиях использовали процедуру двойного связывания, а выделенные курсивом атомы соединяли 30 мин одиночным связыванием. ClAc-Tyr-[N-Me]Ala-Asn-Pro-Dap-Leu-Hyp-Trp-Dab-[(S)-2-амино-3-(1-(карбоксиметил)-1H-индол-3-ил)пропановая кислота]-[N-Me]Nle-[N-Me]Nle-Leu-Cys-Gly-[(S)-пропаргилглицин]; где (S) пропаргилглицин был включен в 2-хлортритильную смолу. После снятия защиты и циклизации в соответствии с вышеописанными процедурами соединение очищали следующим образом: Неочищенный материал очищали с помощью препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, 5 мкм частицы; подвижная фаза A: 5:95 метанол: вода с 10 mM ацетатом аммония; подвижная фаза B: 95:5 метанол: вода с 10 mM ацетатом аммония; градиент: 45-85% B более 30 мин, затем 5-минутное выдерживание при 100% B; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили центрифугированием. Выход продукта составил 16,4 мг, а его расчетная чистота с помощью анализа LCMS составляла 96%. Условие анализа A: время удерживания=1.49 мин; ESI-MS(+) m/z 992.3 (M+2H), наиболее многочисленный ион. Условие анализа B: время удерживания=3.02 мин; ESI-MS(+) m/z 992.3 (M+2H), наиболее многочисленный ион; ESI-HRMS(+) m/z. Рассчитано: 991,9953 (M+2H). Найдено: 991,9926 (M+2H).

Синтез [<sup>18</sup>F]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина



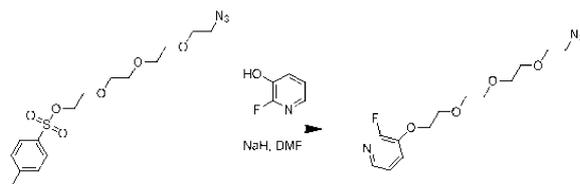
Реагенты и условия: а) NaN<sub>3</sub>, этанол 90°C 17 ч; б) NaH, 2-нитропиридин-3-ол 0-60°C, 4 ч; в) K.2.2.2 K[<sup>18</sup>F], DMSO 120°C 10 мин.

Пример 1. Получение 2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этил-4-метилбензолсульфоната



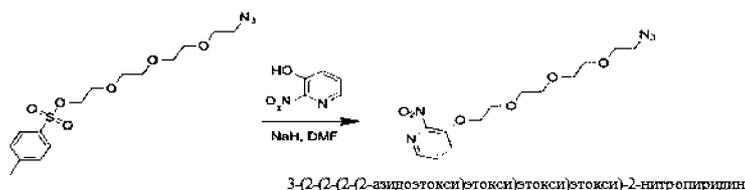
Смесь (оксибис-(этан-2,1-диил))бис-(окси)бис-(этан-2,1-диил)бис-(4-метилбензолсульфоната) (5 г, 9,95 ммоль) и азида натрия (0,647 г, 9,95 ммоль) растворяли в этаноле (50 мл) и реакционную смесь кипятили с обратным холодильником при 90°C в течение 17 ч. Растворитель удаляли с использованием парциального вакуума и затем загружали на 40-граммовый картридж из кремнезема и очищали флэш-хроматографией (IscoCombiFlash - элюировали с применением способа линейного градиента, начиная с 10% этилацетата в гексанах и доходя до 90% этилацетата в гексанах в течение 45 мин). Объединенные фракции проверяли с помощью TLC и объединяли с получением 2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этил-4-метилбензолсульфоната в виде бесцветного масла. Из-за реакционной природы 2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этил-4-метилбензолсульфонатного продукта этот материал использовали "как есть" без каких-либо дополнительных характеристизаций.

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



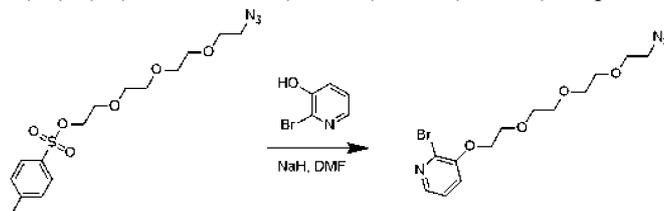
К суспензии гидрида натрия (0,129 г, 3,21 ммоль) в DMF (10 мл) при 0°C по каплям добавляли перемешиваемый раствор 2-фторпиридин-3-ола (0,363 г, 3,21 ммоль) в DMF (5 мл), а затем по каплям добавляли раствор 2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этил-4-метилбензолсульфоната (1,00 г, 2,68 ммоль) в DMF (5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

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



Гидрид натрия (0,121 г, 3,01 ммоль) (60%-ная суспензия в масле) растворяли в DMF (7,0 мл) и полученную суспензию охлаждали до 0°C. Медленно добавляли раствор 2-нитропиридин-3-ола (0,384 г, 2,74 ммоль) в DMF (1,5 мл) с последующим добавлением по каплям 2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этил-4-метилбензолсульфоната (1,023 г, 2,74 ммоль) в DMF (1,5 мл). Суспензию выдерживали при 0°C в течение 10 мин, затем доводили до комнатной температуры в течение 2 ч с последующим нагреванием при 60°C в течение 72-часового периода. Реакцию гасили 10 мл DI водой с последующей экстракцией этилацетатом (3×10 мл). Объединенные экстракты EtOAc промывали концентрированным рассолом (10 мл), сушили над сульфатом натрия, фильтровали и выпаривали при пониженном давлении с получением светло-желтого масла. Неочищенный продукт очищали флэш-хроматографией. 24 г картриджа с кремнеземом, 25 мл/мин, начиная с 10% этилацетата в гексанах с последующим линейным изменением до 50% этилацетата в гексанах в течение 25-минутного периода. По истечении этого времени градиент выдерживали в этой композиции растворителя в течение 10-минутного периода, а затем заменяли на 100% этилацетат в течение 10 мин. 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-нитропиридин элюировали между 30-40-минутной порцией хроматограммы и объединенные фракции выпаривали при пониженном давлении, затем под вакуумом в течение 2 ч с получением 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-нитропиридина (687 мг, 1,973 ммоль, выход 72,0%) в виде светло-желтого масла. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 8.11 (dt, J=4.9, 1.6 Гц, 1H), 7.60 (ddd, J=10.0, 8.1, 1.5 Гц, 1H), 7.52 (ddd, J=7.9, 4.9, 0.7 Гц, 1H), 4.30-4.16 (m, 2H), 3.95-3.83 (m, 2H), 3.80-3.61 (m, 10H), 3.38 (t, J=5.1 Гц, 2H) <sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц, хлороформ-d) d 147.3, 139.5, 128.4, 124.4, 71.1, 70.7, 70.6, 70.0, 69.9, 69.3, 50.7. HRMS (ESI) Теория: C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup> m/z 342.1408; найдено 342.1409.

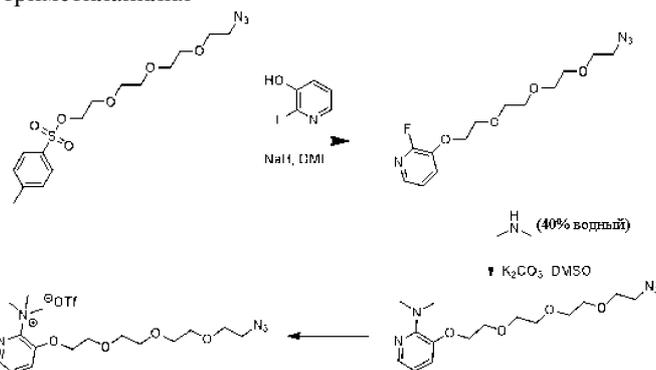
Пример 4. Синтез 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-бромпиридина



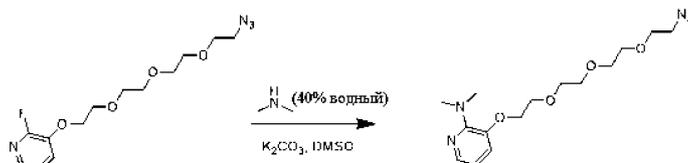
К суспензии гидрида натрия (NaH, 25,7 мг, 0,643 ммоль) в диметилформамиде (DMF, 5 мл) при 0°C по каплям добавляли раствор 2-бромпиридин-3-ола (112 мг, 0,643 ммоль) в DMF (1 мл) с последующим добавлением по каплям раствора 2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этил-4-метилбензолсульфоната

(200 мг, 0,536 ммоль) в DMF (1 мл). Суспензию выдерживали при 0°C в течение 10 мин, затем доводили до температуры окружающей среды и выдерживали в течение 1 ч, затем нагревали при 60°C в течение 4 ч. По окончании нагревания растворитель неочищенной реакционной смеси удаляли в вакууме. Неочищенную реакцию восстанавливали в 50 мл этилацетата, промывали 2×50 мл водного раствора рассола, и органический слой сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали под вакуумом. Неочищенную реакцию очищали с использованием ВЭЖХ с обращенной фазой с получением 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-бромпиридина, TFA (112 мг, 0,229 ммоль, выход 42,7%) в виде светло-желтого масла. HRMS ESI m/z (M+H). Теория C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>4</sub>O<sub>4</sub> 375.0664 найдено 375.0662; <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.97 (dd, J=4.6, 1.5 Гц, 1H), 7.54 (dd, J=8.2, 1.6 Гц, 1H), 7.40 (dd, J=8.1, 4.6 Гц, 1H), 4.24 (dd, J=5.3, 3.9 Гц, 2H), 3.85-3.78 (m, 2H), 3.68-3.62 (m, 2H), 3.62-3.52 (m, 8H), 3.42-3.34 (m, 2H).

Синтез соединения триметиланилия

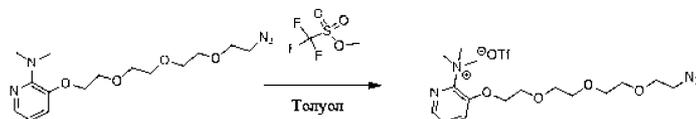


Пример 5. Синтез 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-N,N-диметилпиридин-2-амин



Смесь 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина (160 мг, 0,509 ммоль), карбоната калия (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 84 мг, 0,611 ммоль) и диметиламина (40% в воде, 0,097 мл, 0,764 ммоль) в диметилсульфоксиде (DMSO, 2,5 мл) нагревали в закрытом герметичном сосуде при 110°C в течение 14 ч. По окончании нагревания растворитель неочищенной реакционной смеси удаляли в вакууме. Неочищенную реакцию восстанавливали в 50 мл этилацетата, промывали 2×50 мл водного раствора рассола и органический слой сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали под вакуумом. Неочищенную реакцию очищали с применением нормально-фазовой хроматографии с получением 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-N,N-диметилпиридин-2-амин (140 мг, 0,413 ммоль, выход 81%) в виде бесцветного масла. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 7.86 (dd, J=4.9, 1.5 Гц, 1H), 7.02 (dd, J=7.8, 1.5 Гц, 1H), 6.73 (dd, J=7.8, 4.9 Гц, 1H), 4.20-4.07 (m, 2H), 3.98-3.86 (m, 2H), 3.81-3.61 (m, 9H), 3.38 (t, J=5.1 Гц, 2H), 3.13-2.94 (m, 6H), 1.69 (s, 2H). HRMS (ESI) Теория: C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> m/z 340.1980; найдено 340.1979.

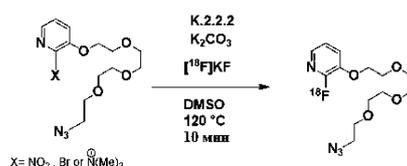
Пример 6. Синтез 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-N,N,N-триметилпиридин-2-аминия



Метилтрифторметансульфонат (0,065 мл, 0,589 ммоль) добавляли к раствору 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-N,N-диметилпиридин-2-амин (40 мг, 0,118 ммоль) в толуоле (1,5 мл) в герметичном контейнере при постоянном потоке азота. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 14-часового периода. Растворитель удаляли и полученный остаток промывали 2×10 мл эфира, азеотропно сушили с 2×1 мл дихлорметана и сушили под глубоким вакуумом в течение ночи, получая 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-N,N,N-триметилпиридин-2-аминий, соль трифторметансульфоната с количественным выходом в виде густого бесцветного масла.

LCMS m/z 354.33; <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.24-8.17 (m, 1H), 7.98 (d, J=8.3 Гц, 1H), 7.75 (ddd, J=8.2, 4.6, 3.2 Гц, 1H), 4.44 (br. s., 2H), 3.88 (d, J=3.9 Гц, 2H), 3.69-3.45 (m, 21H).

Пример 7. Синтез [<sup>18</sup>F]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина с использованием 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-N,N,N-триметилпиридин-2-аминия, соль трифторметансульфоната



Водный раствор [<sup>18</sup>F]-фторида (2,0 мл, 33,3 ГБк/ 900 мКи) был приобретен у P.E.T. Net® Pharmaceuticals в West Point PA и непосредственно перенесен в Sep-Pak light QMA [картридж The Sep-Pak light QMA был предварительно кондиционирован последовательно 5 мл 0,5 М бикарбоната калия, 5 мл деионизированной воды и 5 мл MeCN перед использованием]. По завершении этого переноса водный [<sup>18</sup>F] фторид высвобождали из QMA Sep-Pak путем последовательного добавления карбоната калия (15 мг/мл, 0,1 мл), а затем смеси карбоната калия (30 мг/мл, 0,1 мл), 4,7,13,16,21,24-гексаокса-1,10-диазабицикло[8.8.8]гексакозана (15 мг, 0,04 ммоль) и 1,2 мл MeCN. Растворитель выпаривали при слабом токе азота при температуре 90°C и вакууме. Азеотропную сушку повторяли дважды с 1 мл порциями ацетонитрила для получения безводного комплекса К.2.2.2/К[<sup>18</sup>F]F. 3-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)-N,N,N-триметилпиридин-2-аминия, соль трифторметансульфоната (2 мг, 5,6 мкмоль) растворяли в 500 мкл DMSO и добавляли к высушенному криптанту. Этот раствор нагревали при 120°C в течение 10 мин. По истечении этого времени сырую реакционную смесь разбавляли 3 мл DI воды. Все содержимое сырой реакционной смеси затем переносили, загружали и очищали с использованием ВЭЖХ с обращенной фазой при следующих условиях: Колонка ВЭЖХ: Luna C18 250×10; растворитель А: 0,1% TFA в DI воде; растворитель В: 0,1% TFA в ацетонитриле со скоростью потока 4,6 мл/мин с использованием изократического метода 32% В, в то время как УФ контролировали при 280 нм. [<sup>18</sup>F]-3-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)-2-фторпиридин выделяли на 24-минутной отметке хроматограммы и собирали в течение 2-минутного периода. Этот продукт собирали в 100-мл колбу, содержащую 10 мл DI воды, и все содержимое доставляли в Sep-Pak Vac tC18 6 cc 1g sep pack от Waters. Из этой реакции выделяли 6,1 ГБк/164 мКи [<sup>18</sup>F]-3-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)-2-фторпиридин. Это было высвобождено из сер-пак, используя 3 мл этанола, и этот раствор восстанавливали с помощью источника тепла при 98°C, слабого потока азота и вакуума в течение 15 мин до тех пор, пока во флаконе не осталась только пленка. Конечный продукт восстанавливали в 100% 1× буфере PBS и стабилизировали в этой среде в течение более 1 ч при 37°C.

[<sup>18</sup>F]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)-2-фторпиридин может быть использован для получения продуктов с меткой <sup>18</sup>F (например, макроциклических пептидов против PD-L1 с меткой <sup>18</sup>F, как описано ниже), используя преимущества "клик"-реакции азидалькина с соответствующими пептидами, содержащими алкины.

Пример 8. Получение макроциклического пептида с радиометкой <sup>18</sup>F с применением "Клик Химии".

А. Фторирование 4-ПЭГ-тозилазидного предшественника с образованием [<sup>18</sup>F]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина.

Водный раствор [<sup>18</sup>F]-фторида (2,0 мл, 29,6 ГБк/ 800 мКи) был приобретен у ИВА в Towada и отправлен на сайт BMS Princeton NJ, и этот образец был перенесен в наш изготовленный на заказ синтез с дистанционным управлением. Этот раствор доставляли в Sep-Pak light QMA [картридж The Sep-Pak light QMA предварительно кондиционировали последовательно 5 мл 0,5 М бикарбоната калия, 5 мл деионизированной воды и 5 мл MeCN перед использованием]. По завершении этого переноса водный [<sup>18</sup>F] фторид высвобождали из QMA Sep-Pak добавлением смеси карбоната калия (30 мг/мл в дистиллированной воде (DI), 0,1 мл), 4,7,13,16,21,24-гексаокса-1,10-диазабицикло[8.8.8]гексакозана (15 мг, 0,04 ммоль) и 1,4 мл ацетонитрила. Растворитель выпаривали под слабым потоком азота при 90°C и вакуумом. Азеотропную сушку повторяли дважды с 1 мл порциями ацетонитрила для получения безводного комплекса К.2.2.2/К[<sup>18</sup>F]F. По завершении этого процесса криптант далее сушили под полным вакуумом в течение 15-минутного периода. Весь процесс занял 35 мин.

К полученному высушенному твердому веществу [<sup>18</sup>F]/криптант добавляли 0,5 мл 2 мг 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)-2-нитропиридина в DMSO и эту смесь нагревали при 120°C в течение 10 мин. По истечении этого времени сырую реакционную смесь разбавляли 3 мл дистиллированной воды и все содержимое затем переносили и загружали на следующую колонку ВЭЖХ при условиях: колонка ВЭЖХ: Luna C18 250×10 мм; растворитель А: 0,1% трифторуксусная кислота (TFA) в дистиллированной воде; растворитель В: 0,1% TFA в ацетонитриле; скорость потока 4,6 мл/мин; давление 1820 PSI; изократический метод 32% В; УФ - 280 нм. Полученный продукт [<sup>18</sup>F]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)-2-фторпиридин ([<sup>18</sup>F]-FPPEGA) выделяли на 24-минутной отметке хроматограммы и собирали в течение 2-минутного периода. Этот продукт собирали в 100-мл колбу, содержащую 15 мл DI воды, и все содержимое доставляли в Sep Pak Vac tC18 6 cc 1g sep pack (PN WAT036795). [<sup>18</sup>F]-FPPEGA высвобождали из Sep Pak с использованием 2,5 мл этанола и этот раствор восстанавливали при 98°C N<sub>2</sub> и вакууме в течение 15-минутного периода до сухости. Это соединение растворяли в 0,1 мл DI воды. Этот продукт анализировали, используя Varian ВЭЖХ с колонкой ВЭЖХ Luna C18 (2) 4,6×150 мм;

растворитель А: 0,1% TFA в DI воде; растворитель В: 0,1% TFA в ацетонитриле; скорость потока 1,0 мл/мин; градиентный метод 0 мин 90% А 10% В; 15 мин 30% А 70% В; 17 мин 30% А 70% В; 18 мин 90% А 10% В; 20 мин 90% А 10% В; УФ - 280 нм. Выделяли 14,1 ГБк (380 мКи) [ $^{18}\text{F}$ ]-FPPEGA. Этот продукт переносили для завершения "клик" химии с алкином, содержащим связывающий макроциклический пептид PD-L1.

В. Связывание [ $^{18}\text{F}$ ]-FPPEGA с макроциклическим пептидом.

Схема синтеза радиоактивно меченого [ $^{18}\text{F}$ ] макроциклического пептида показана на фиг. (а).

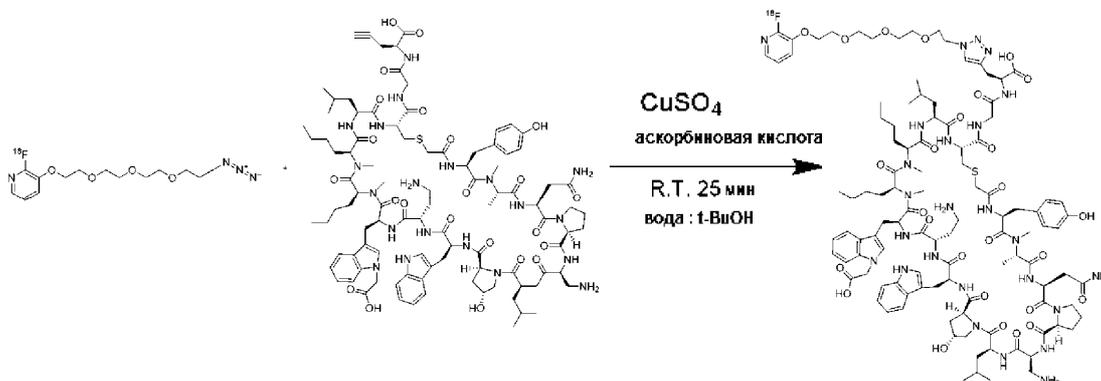
(S)-2-(2-(((6S,9S,12S,18R,21S,24S,27S,30S,33S,36S,38aS,40R,44R,47S,49aS)-36-((1H-индол-3-ил)метил)-6-(2-амино-2-оксоэтил)-33-(2-аминоэтил)-47-(аминометил)-24,27-дибутил-30-((1-(карбоксиметил)-1H-индол-3-ил)метил)-40-гидрокси-12-(4-гидроксибензил)-21,44-диизобутил-9,10,25,28-тетраметил-5,8,11,14,20,23,26,29,32,35,38,43,46,49-тетрадекаоксогексатетраконтагидро-1H,5H-дипирроло[2,1-g1:2',1'-x][1]тиа[4,7,10,13,16,19,22,25,31,34,37,40,43]тридекаазациклопентатетраконтин-18-карбоксамидо)ацетамидо)пент-4-иновуую кислоту (0,75 мг, 0,378 ммоль) растворяли в 0,250 мл DI воды и 0,25 мл трет-бутилового спирта. К этому раствору добавляли 0,250 мл DI водного раствора, содержащего 1 мг сульфата меди и 1 мг аскорбата натрия. Наконец, добавляли 0,1 мл раствора 14.1 ГБк (380 мКи) [ $^{18}\text{F}$ ]-FPPEGA (полученного, как описано в разделе А), и реакцию осторожно перемешивали при температуре окружающей среды в течение 20 мин. К содержимому этой неочищенной реакционной смеси добавляли 0,5 мл ацетонитрила с последующим добавлением 1,5 мл DI воды и эту смесь очищали, используя колонку ВЭЖХ с обращенной фазой. Колонка ВЭЖХ: Luna C18 250×10 мм; растворитель А: 0,1% трифторуксусная кислота (TFA) в DI воде; растворитель В: 0,1% TFA в ацетонитриле; скорость потока 4,6 мл/мин; давление 1820 PSI; изократический метод 37% В; УФ - 220 нм. Продукт выделяли между отметкой хроматограммы 27-31 мин и собирали в течение 4-минутного периода, как показано на фиг. (b). Выделили 2,5 ГБк (67 мКи) [ $^{18}\text{F}$ ]-((S)-2-(2-(((6S,9S,12S,18R,21S,24S,27S,30S,33S,36S,38aS,40R,44S,47S,49aS)-36-((1H-индол-3-ил)метил)-6-(2-амино-2-оксоэтил)-33-(2-аминоэтил)-47-(аминометил)-24,27-дибутил-30-((1-(карбоксиметил)-1H-индол-3-ил)метил)-40-гидрокси-12-(4-гидроксибензил)-21,44-диизобутил-9,10,25,28-тетраметил-5,8,11,14,20,23,26,29,32,35,38,43,46,49-тетрадекаоксогексатетраконтагидро-1H,5H-дипирроло[2,1-g1:2',1'-x][1]тиа[4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43]тетрадекаазациклопентатетраконтин-18-карбоксамидо)ацетамидо)-3-(1-(2-(2-(2-(2-(2-(2-фторпиридин-3-ил)окси)этокси)этокси)этокси)этил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)пропановой кислоты. Этот раствор дополнительно разбавляли 20 мл DI воды и этот раствор переносили в C-18 сер-пак (Waters 50 мг, который предварительно активировали 5 мл этанола, затем 10 мл DI воды) для удаления любого органического растворителя из раствора. Этот сер-пак далее промывали 10 мл стерильной воды для инъекций. Этот продукт высвобождали из сер-пак 0,5 мл этанола, стерильно фильтровали в стерильный флакон и разбавляли физиологическим раствором для инъекций до 5% этанола по объему раствора. Этот продукт анализировали с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой, как показано на фиг. (b): химическая идентификация с совместной инъекцией нерадиоактивного стандарта, радиохимическая чистота и химическая чистота, удельная радиоактивность (специфическая активность). Выделенный продукт, соэлюированный с нерадиоактивным референсным стандартом, был 100% радиохимически и 95% химически чистым с удельной радиоактивностью 0,37 (10 мКи) ГБк/ммоль.

Аналитическая ВЭЖХ с обращенной фазой проводилась со следующими параметрами:

колонка Zorbax SB-C18 250×4,6 мм; растворитель А: 0,05% муравьиной кислоты в DI воде; растворитель В: 0,05% в ацетонитриле; скорость потока 1,0 мл/мин; градиентный метод от 30 до 50% В в течение 20 мин; УФ - 220 нм.

Фиг. (а)

Схема синтеза радиоактивно меченого связывающего PD-L1 макроциклического пептида

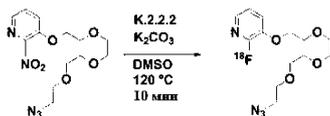


[ $^{18}\text{F}$ ]-((S)-2-(2-(((6S,9S,12S,18R,21S,24S,27S,30S,33S,36S,38aS,40R,44S,47S,49aS)-36-((1H-индол-3-ил)метил)-6-(2-амино-2-оксоэтил)-33-(2-аминоэтил)-47-(аминометил)-24,27-дибутил-30-((1-(карбоксиметил)-1H-индол-3-ил)метил)-40-гидрокси-12-(4-гидроксибензил)-21,44-диизобутил-9,10,25,28-тетра-

метил-5,8,11,14,20,23,26,29,32,35,38,43,46,49-тетрадекаоксогексатетраконтагидро-1Н,5Н-дипирроло[2,1-*g*1:2',1'-*x*][1]тиа[4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43]тетрадекаазациклопентатетраконтин-18-карбоксамидо)ацетамидо)-3-(1-(2-(2-(2-(2-(2-фторпиридин-3-ил)окси)этокси)этокси)этокси)этил)-1Н-1,2,3-триазол-4-ил)пропановая кислота может быть использована во множестве *in vitro* и/или *in vivo* применений для визуализации, включая диагностическую визуализацию, фундаментальные исследования и радиотерапевтические применения. Конкретные примеры возможной диагностической визуализации и радиотерапевтических применений включают определение местоположения, относительную активность и/или количественную оценку PD-L1 положительных опухолей, радиоиммуноанализ PD-L1 положительных опухолей и автордиографию для определения распределения PD-L1 положительных опухолей у млекопитающего или в образце его органа или ткани.

В частности, [ $^{18}\text{F}$ ]-(*S*)-2-(2-((6*S*,9*S*,12*S*,18*R*,21*S*,24*S*,27*S*,30*S*,33*S*,36*S*,38*aS*,40*R*,44*S*,47*S*,49*aS*)-36-((1Н-индол-3-ил)метил)-6-(2-амино-2-оксоэтил)-33-(2-аминоэтил)-47-(аминометил)-24,27-дибутил-30-((1-(карбоксиметил)-1Н-индол-3-ил)метил)-40-гидрокси-12-(4-гидроксибензил)-21,44-диизобутил-9,10,25,28-тетраметил-5,8,11,14,20,23,26,29,32,35,38,43,46,49-тетрадекаоксогексатетраконтагидро-1Н,5Н-дипирроло [2,1-*g* 1:2', 1'-*x*][1]тиа[4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43]тетрадекаазациклопентатетраконтин-18-карбоксамидо)ацетамидо)-3-(1-(2-(2-(2-(2-((2-фторпиридин-3-ил)окси)этокси)этокси)этокси)этил)-1Н-1,2,3-триазол-4-ил)пропановая кислота пригодна для визуализации с помощью позитронно-эмиссионной томографии (PET) PD-L1 положительных опухолей в легких, сердце, почках, печени и коже и других органах человека и подопытных животных. ПЭТ-визуализация с применением [ $^{18}\text{F}$ ]-(*S*)-2-(2-((6*S*,9*S*,12*S*,18*R*,21*S*,24*S*,27*S*,30*S*,33*S*,36*S*,38*aS*,40*R*,44*S*,47*S*,49*aS*)-36-((1Н-индол-3-ил)метил)-6-(2-амино-2-оксоэтил)-33-(2-аминоэтил)-47-(аминометил)-24,27-дибутил-30-((1-(карбоксиметил)-1Н-индол-3-ил)метил)-40-гидрокси-12-(4-гидроксибензил)-21,44-диизобутил-9,10,25,28-тетраметил-5,8,11,14,20,23,26,29,32,35,38,43,46,49-тетрадекаоксогексатетраконтагидро-1Н,5Н-дипирроло [2,1-*g* 1:2', 1'-*x*][1]тиа[4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43]тетрадекаазациклопентатетраконтин-18-карбоксамидо)ацетамидо)-3-(1-(2-(2-(2-(2-((2-фторпиридин-3-ил)окси)этокси)этокси)этокси)этил)-1Н-1,2,3-триазол-4-ил)пропановой кислоты может быть использована для получения следующей информации: взаимосвязь между уровнем заполнения тканей лекарственными средствами для лечения PD-L1 опухолей и клинической эффективностью у пациентов; выбор дозы для клинических испытаний лекарственных средств для лечения PD-L1 опухолей до начала долгосрочных клинических исследований; сравнительные потенциалы структурно новых лекарственных средств для лечения PD-L1 опухолей; исследование влияния лекарственных средств для лечения PD-L1 опухолей на аффинность и плотность транспортера *in vivo* во время лечения клинических мишеней лекарственными средствами для лечения PD-L1 опухолей; изменения плотности и распределения PD-L1 положительных опухолей во время эффективного и неэффективного лечения.

Пример 9. Автоматизированное получение [ $^{18}\text{F}$ ]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина в соответствии с общей методикой синтетического радиосинтеза на блоке синтеза GE TRACERlab FX2 N



Автоматизированный синтез с использованием коммерческого модуля синтеза (GE) TRACERlab FX2 N.

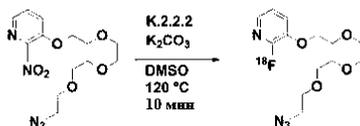
Автоматизированный синтез [ $^{18}\text{F}$ ]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина проводили с применением модуля синтеза GE TRACERlab FX2 N некассетного типа. Настройка блока синтеза представлена в табл. (1). Водный раствор [ $^{18}\text{F}$ ]-фторида (2,0 мл, 29,6 ГБк/800 мКи) доставляли в Sep-Pak light QMA (картридж Sep-Pak light QMA предварительно кондиционировали последовательно 5 мл 0,5 М бикарбоната калия, 5 мл деионизированной воды и 5 мл ацетонитрила перед использованием]. По завершении этого переноса водный [ $^{18}\text{F}$ ] фторид высвобождали из QMA Sep-Pak путем добавления в реактор смеси для элюирования (из "VI"). Растворитель выпаривали под слабым потоком азота и вакуума. Раствор предшественника (из "V3") добавляли к высушенному остатку криптана и эту реакционную смесь нагревали при 120°C в течение 10 мин. Затем к неочищенной реакционной смеси в реакторе добавляли 4 мл дистиллированной воды (из "V4"), и смесь переносили в 5 мл петлевой дозатор полупрепаративной ВЭЖХ с помощью датчика жидкости, который контролирует завершение загрузки. Смесь загружают на колонку полупрепаративной ВЭЖХ (Luna C18(2). 250×10 мм, Phenomenex). Смесь 35% ацетонитрила в водном 0,1%-ном растворе трифторуксусной кислоты пропускали через колонку со скоростью 4,6 мл в минуту. Продукт собирали из этой колонки ВЭЖХ в разбавительную колбу, содержащую 15 мл дистиллированной воды, и все ее содержимое переносили в твердофазный экстракционный картридж tC18 1 г. Из этого картриджа (из "V14") высвобождали 352 мКи (13 ГБк) [ $^{18}\text{F}$ ]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина 3 мл этанола, который может быть использован для получения пептидных продуктов, меченных  $^{18}\text{F}$ , с использованием преимущества "клик" ацид-алкиной

реакции с соответствующим пептидом, содержащим алкины.

Таблица 1

Флаконт 1 (V1)	16 мг К.2.2.2, 3 мг Карбоната калия, растворенные в 0,1 мл дистиллированной воды и 1,4 мг ацетонитрила
Флаконт 3 (V3)	2 мг 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-нитрипиридина в 0,5 мл DMSO
Флаконт 4 (V4)	4 мл дистиллированной воды
Флаконт 14 (V14)	3 мл 100% этанола
Колба для Разбавления	15 мл дистиллированной воды
Картридж 1 (C1)	tC18 6 cc 1 g sep pack
Колонка ВЭЖХ	Luna C18(2), 250x10 мм, 5 мкм, Phenomenex
Растворитель ВЭЖХ	35% ацетонитрил в водном 0,1% растворе трифторуксусной кислоты
поток ВЭЖХ	4,6 мл/мин

Пример 10. Автоматизированное получение [ $^{18}\text{F}$ ]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина в соответствии с общей методикой синтетического радиосинтеза на блоке синтеза IBA Synthera



Автоматизированный синтез с применением коммерческого модуля синтеза Synthera (IBA).

Автоматизированный синтез [ $^{18}\text{F}$ ]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина проводили с использованием модуля синтеза IBA Synthera кассетного типа и соответствующим образом собранного набора интегрирующего флюидного процессора. Набор интегрирующего флюидного процессора (IFP) загружали соответствующими предшественниками для этого синтеза, что представлено в табл. (2). Очистку проводили на блоке Varian ВЭЖХ. Заполнение петлевого дозатора ВЭЖХ контролировали постоянным потоком азота в блоке ВЭЖХ. Настройка обоих автоматов представлена в табл. (2). Водный [ $^{18}\text{F}$ ]-фторидный раствор (2,0 мл, 29,6 ГБк/800 мКи) доставляли в Sep-Pak light QMA (картридж Sep-Pak light QMA предварительно кондиционировали последовательно 5 мл 0,5 М бикарбоната калия, 5 мл деионизированной воды и 5 мл ацетонитрила перед использованием]. По завершении этого переноса водный [ $^{18}\text{F}$ ] фторид высвобождали из QMA Sep-Pak путем добавления в реактор элюирующей смеси (из "V1"). Растворитель выпаривали под слабым потоком азота и вакуумом. Раствор предшественника (из "V2") добавляли к высушенному остатку криптана и эту реакционную смесь нагревали при 120°C в течение 10 мин. Затем к неочищенной реакционной смеси в реакторе добавляли 3 мл дистиллированной воды (из "V4") и смесь переносили в 5 мл петлевой дозатор полупрепаративной ВЭЖХ с помощью датчика жидкости, который контролирует завершение загрузки. Смесь загружают на колонку полупрепаративной ВЭЖХ (Luna C18(2), 250x10 мм, Phenomenex). Смесь 35% ацетонитрила в водном 0,1%-ном растворе трифторуксусной кислоты пропускали через колонку со скоростью 4,6 мл/мин. Продукт собирали из этой колонки ВЭЖХ в разбавительную колбу, содержащую 15 мл дистиллированной воды, и все ее содержимое переносили в твердофазный экстракционный картридж tC18 1 г. Из этого картриджа высвобождали 325 мКи (12 ГБк) [ $^{18}\text{F}$ ]-3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-фторпиридина 3 мл этанола, который может быть использован для получения пептидных продуктов, меченных  $^{18}\text{F}$ , путем использования "клик" реакции азидалкина с соответствующим пептидом, содержащим алкины.

Таблица 2

Флаконт 1 (V1)	22 мг К.2.2.2, 4 мг Карбоната калия, растворенные в 0,3 мл дистиллированной воды и 0,3 мг ацетонитрила
Флаконт 2 (V2)	2 мг 3-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этокси)-2-

	нитрипиридина в 0,5 мл DMSO
Флакон 4 (V4)	3 мл дистиллированной воды
Колба для Разбавления	15 мл дистиллированной воды
Картридж 1 ( C1)	tC18 6 cc 1g sep pack
Колонка ВЭЖХ	Luna C18(2), 250x10 мм, 5 мкм, Phenomenex
Растворитель ВЭЖХ	35% ацетонитрил в водном 0,1% растворе трифторуксусной кислоты
поток ВЭЖХ	4,6 мл/мин

Пример 11. Различение PD-L1-положительных опухолей от PD-L1-отрицательных опухолей с помощью агента для визуализации, представляющего собой макроциклический пептид против PD-L1.

Для ПЭТ-визуализации быстрые показатели очистки крови обеспечивают преимущество перед более медленными просветляющими агентами, такими как антитела, путем минимизации времени, необходимого для "фоновых" сигналов зонда, чтобы обедниться из несоответствующей ткани. В клинике для ПЭТ-трассеров на основе антител с продолжительным периодом полужизни в крови может потребоваться несколько дней ожидания после инъекции, прежде чем могут быть собраны изображения. Быстрые просветляющие зонды открывают дверь для высококонтрастных изображений, которые могут быть собраны в тот же день, когда вводится зонд, и, что очень важно, они также могут служить для уменьшения общего облучения изучаемых животных или исследуемых пациентов.

В этом эксперименте макроциклический пептид PD-L1, меченный [<sup>18</sup>F], получали, как описано в приведенных выше примерах, тестировали на его способность различать hPD-L1-положительные опухоли и hPD-L1-отрицательные опухоли у мышей. Мышей, несущих двусторонние ксенотрансплантатные опухоли, получали путем введения  $2 \times 10^6$  клеток карциномы легкого человека hPD-L1(+) L2987 и  $4 \times 10^6$  клеток карциномы толстой кишки человека hPD-L1(-) HT-29 подкожно в противоположные стороны мышцы. После того как опухоли достигли около 300 мм<sup>3</sup> (через приблизительно 2-3 недели после имплантации клеток), животные были отобраны для визуализации. Массу тела и размер опухоли в каждом исследовании измеряли и записывали в день визуализации перед процедурой визуализации. Мышей помещали в анестезиологическую индукционную камеру и подавали 3%-ную изофлурановую ингаляционную анестезию в 100% O<sub>2</sub> со скоростью 1-1,5 л/мин. После усыпления мышей удаляли из индукционной камеры и помещали в четырехкамерную камеру для мышей из плексигласа (изготовлен по заказу BMS-Applied Biotechnology group), в то время как они продолжали получать 1-1,5% изофлурановую ингаляционную анестезию, доставляемую в 100% O<sub>2</sub> при скорости 2 л/мин через носовой конус. Животных сохраняли в тепле, используя внешний автономный температурный регуляторный блок (M2M Imaging Corp) для предотвращения гипотермии во время визуализации. Во время процедуры визуализации непрерывно контролируется дыхание мышей, а изофлуран можно регулировать в зависимости от глубины анестезии. Мышей затем помещали в обычный фиксатор для удерживания животных, имеющий емкость на 4 животных, где они оставались под наркозом на протяжении всего исследования. Фиксатор для удерживания животных был перенесен на сканер microPET® F120™ (Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN). Осевое поле видимости этого прибора составляет 7,6 см. При таком ограничении животные располагались так, что область сканирования находилась от непосредственно перед глазами до приблизительно основания хвоста. 10-минутное трансмиссионное изображение было получено при использовании точечного источника <sup>57</sup>Co с целью коррекции затухания конечных ПЭТ-изображений. После трансмиссионного сканирования растворы радиотрассеров вводили через ранее установленные катетеры хвостовой вены и получали 2-часовое эмиссионное изображение. Инъекцируемые растворы с радиотрассером инъекцировали, в целом, 8 мышам (масса тела 22,2±2,0 г) с объемами опухоли 203,0±51,4 мм<sup>3</sup> для HT-29 и 422,9±128,4 мм<sup>3</sup> для L2987 и визуализировали 16-17 дней после имплантации клеток. Каждая мышь получала одну инъекцию дозы SC связывающего PD-L1 макроциклического пептида 60 мг/кг (N=4) или физиологического раствора (N=4) за 30 мин до IV инъекции макроциклического пептида PD-L1, меченого [<sup>18</sup>F], (124,0±8,4 мКи, масса трассера: 1,0±0,4 мкг/кг). Изображения были реконструированы с использованием алгоритма maximum a posteriori (MAP) с коррекцией затухания с использованием собранных трансмиссионных изображений и скорректированных для распада радиоизотопов. В конечных изображениях представляющие интерес области (ROI) были нарисованы вокруг границы опухоли с использованием программного обеспечения ASIPro (Siemens Preclinical Solutions). Кривые активности во времени были рассчитаны для каждого ROI, чтобы получить количественный обзор радиотрассера в объеме опухоли в течение 2-часового эмиссионного изображения. Для окончательного сравнения индивидуальные кривые активности во времени были нормализованы на основе введенной дозы радиотрассера для каждого конкретного животного. Поглощение радиотрассера сравнивали по опухолям с использованием последних 10 мин каждой кривой активности во времени (90-100 мин после инъекции радиотрассера). Используя эту методологию, поглощение радиотрассера в ксенотрансплантатах hPD-L1(+) L2987 составило 8,1×, что наблюдалось в ксенотрансплантатах hPD-L1(-) HT-29 у животных, получавших только

макроциклический пептид PD-L1, меченный [ $^{18}\text{F}$ ]. У животных, получавших дозу 60 мг/кг СВ связывающего PD-L1 макроциклического пептида за 30 мин до инъекции радиотрассера. Поглощение в ксенотрансплантатах hPD-L1(+) L2987 составило всего 0,7×, что наблюдалось в ксенотрансплантатах hPD-L1(-) HT-29 (фиг. 1, 2 и табл. 3).

Таблица 3  
Стандартные значения поглощения (SUV) в опухолях HT-29 и L2987, полученные из ПЭТ-изображений в примере 11

связывающий PD-L1 макроциклический пептид	Мышь #	Масса тела (грамм)	Объем м (мм <sup>3</sup> )	Объем м (мм <sup>3</sup> )	Введенная доза (мкКи)	Масса трассера (мкг/кг)	SUV в HT29	SUV в L2987
0 мг/кг (Физиологический раствор)	Мышь 3	20.4	180	500	132.6	4.60	0.036	0.213
	Мышь 7	21.3	144	320	110.9	4.63	0.033	0.231
	Мышь 19	24.4	162	245	100.5	1.45	0.047	0.452
	Мышь 23	22.1	87.5	126	81.7	1.66	0.031	0.297
	Среднее (Stdev)	22.1 (1.7)	143.4 (40.0)	297.8 (156.7)	106.4 (21.2)	3.1 (1.8)	0.037 (0.007)	0.298 (0.109)
60 мг/кг	Мышь 6	23.0	64	171.5	114.4	4.36	0.102	0.060
	Мышь 12	22.0	126	288	90.5	4.58	0.084	0.055
	Мышь 22	23	126	760.5	71.3	1.41	0.030	0.042
	Мышь 28	23.8	108	320	118.1	2.63	0.065	0.043
	Мышь (Stdev)	23.0 (0.7)	106.0 (29.3)	385.0 (258.3)	98.6 (21.9)	3.2 (1.5)	0.071 (0.031)	0.050 (0.009)

Эти результаты обеспечивают прямую визуализацию дифференцирования ксенотрансплантатных опухолей hPD-L1(+) от опухолей hPD-L1(-) in vivo. Специфичность была дополнительно продемонстрирована путем предварительного дозирования 60 мг/кг связывающего PD-L1 макроциклического пептида за 30 мин до инъекции радиотрассера, что привело к снижению поглощения радиотрассера в опухолях hPD-L1(+) до уровня ксенотрансплантатов hPD-L1(-). Это дополнительно подтверждает использование макроциклических пептидов PD-L1 для визуализации экспрессии ткани PD-L1 с использованием ПЭТ-визуализации.

Пример 12. ПЭТ-визуализация в примате, не являющемся человеком, с помощью визуализирующего средства, представляющего собой макроциклический пептид против PD-L1.

Агенты для визуализации на основе миламолекул против PD-L1 также показали сходные результаты при выполнении на яванских макаках. В этих исследованиях макроциклический пептид PD-L1, меченный [ $^{18}\text{F}$ ], полученный, как описано в вышеприведенных примерах, испытывали на его способность давать высококонтрастные изображения у яванских макаков. Описанные в настоящем документе макроциклические пептиды против PD-L1 поддерживают высокую аффинность к PD-L1 яванского макака (но имеют низкую аффинность к PD-L1 грызунов). Кроме того, поскольку яванские макаки не содержат опухолей PD-L1(+), как в моделях на мышах, эффективность визуализации оценивалась в первую очередь на фоновых уровнях, измеренных в изображениях в контексте эндогенной экспрессии PD-L1 (с низким фоном, что давало возможность для высокочувствительного обнаружения тканей PD-L1(+)). В этих исследованиях фоновые уровни в результирующих ПЭТ-изображениях были очень низкими, причем заметное накопление радиотрассера отмечалось, главным образом, в почках, селезенке и мочевом пузыре.

Самцов яванского макака с ранее инсталлированным портом сосудистого доступа (VAP) анестезировали 0,02 мг/кг атропина, 5 мг/кг телазола и 0,01 мг/кг бупренорфина I.M. (все втянуты в один шприц). Затем помещают катетер i.v. в цефалический сосуд для введения жидкости во время процедуры визуализации.

зации для поддержания гидратации. Животных интубировали эндотрахеальной трубкой - как правило, 3,0 мм - и переносили на кровать для визуализации прибором microPET® F220™ (Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN). Анестезию поддерживали изофлураном и кислородом, жидкости (LRS) вводили I.V. со скоростью 6 мл/кг/ч во время процедуры визуализации. Поскольку аксиальное поле видимости прибора microPET® F220™ составляет всего 7,6 см, получали изображения над 5 отдельными положениями кровати для того, чтобы создать составное изображение животных от области чуть выше сердца до области приблизительно таза.

Для каждого поля зрения сначала было получено 10-минутное трансмиссионное изображение с использованием точечного источника  $^{57}\text{Co}$  с целью коррекции затухания конечных ПЭТ-изображений. После того как трансмиссионные изображения были получены для всех положений кровати, через установленный VAP вводили приблизительно 1,7 мКи (приблизительно 0,12 мкг/кг) макроциклического PD-L1 пептидного трассера, меченного [ $^{18}\text{F}$ ]. Затем последовательно получали эмиссионные сканы с 5 минутной задержкой для каждого положения кровати, начиная с положения 1, центрированного приблизительно на сердце, и двигаясь к тазу животного. После того как изображения были получены в каждом положении (от 1 до 5), кровать для визуализации перемещалась обратно в положение 1 кровати и процесс повторялся. Используя эту процедуру, было получено в общей сложности 5 отдельных изображений для каждого положения кровати в течение всего времени исследования с визуализацией.

Индивидуальные изображения реконструировали с применением алгоритма обратной проекции с фильтрацией (FBP) с коррекцией затухания с использованием собранных трансмиссионных изображений и скорректированы для распада радиоизотопов. Затем конечные составные изображения были получены путем совмещения изображений всех 5 положений кровати, полученных в одном проходе (т.е. из каждого набора последовательных изображений положений кровати с 1 по 5 было создано одно составное изображение), охватывающие все время исследования с визуализацией. Конечные изображения визуально проверялись для того, чтобы отметить области видимого поглощения радиотрассера (т.е. селезенки, печени, почек) и фоновой ткани (мышечной) (фиг. 3). Фоновое накопление макроциклического пептидного PD-L1 радиотрассера, меченного [ $^{18}\text{F}$ ], было очень низким с небольшим сигналом, видимым в фоновых тканях, таких как мышечная. Кроме того, поглощение было подтверждено в селезенке, которое представляет собой PD-L1(+) на основе иммуногистохимии и экспрессии мРНК. Таким образом, исследования на яванских макаках демонстрируют потенциал высокочувствительной визуализации PD-L1 в контексте эндогенного PD-L1. Для определения природы специфического связывания в селезенке яванских макаков было проведено блокирующее исследование следующим образом.

Яванский макак (4,4 кг, самец) получал единственную IV инъекцию макроциклического пептидного PD-L1 радиотрассера, меченного [ $^{18}\text{F}$ ], (~1,7 мКи, масса: 0,21 мкг/кг) в начале исследования. На следующий день (после дозы) тот же NHP получал одну SC дозу 2 мг/кг связывающего макроциклического пептида против PD-L1 за 2 ч до инъекции радиотрассера (~1,7 мКи, масса: 0,12 мкг/кг). Поглощение трассера в различных органах приведено в табл. 4. Репрезентативные ПЭТ-изображения исходной точки и точки пост-дозы представлены на фиг. 3. Концентрации связывающего макроциклического пептида против PD-L1 в плазме измеряли через 0, 10, 30, 60, 90 мин после инъекции радиотрассера в каждый день визуализации (табл. 4). Специфический сигнал связывания наблюдался внутри селезенки приматов, отличных от человека, причем 93% поглощения трассера блокировалось 2 мг/кг специфического связывающего PD-L1 макроциклического пептида.

Исследования ПЭТ на грызунах и яванских макаках показывают, что макроциклический пептид PD-L1 против человека, меченный  $^{18}\text{F}$ , представляет собой сильные и специфические зонды для *in vivo* помечки PD-L1 положительных тканей с потенциалом для высокочувствительного обнаружения тканей с низким уровнем экспрессии PD-L1.

Эксперименты по визуализации *in vivo* также проводились с антителом против PD-L1, и области, которые этот визуализирующий агент обнаруживал, были теми же областями, которые были обнаружены с помощью визуализирующего PD-L1 агента, что подтверждает, что милламоллекулярные средства для визуализации успешно обнаруживают положительные PD-L1 клетки *in vivo*.

Таблица 4

Трассер SUV в каждом органе в исходной точке и после дозы 2 мг/кг связывающего PD-L1 макроциклического пептида

SUV	Контрольная группа	Блокировано 2 мг/кг связывающим PD-L1 макроциклическим пептидом	% Изменения
Селезенка	19.720	1.423	-92.8%
Почечная Лоханка	8.855	24.061	171.7%
Корковое вещество Почки	8.420	10.846	28.8%
Двенадцатиперстная кишка	8.840	8.756	-0.9%
Печень	9.163	3.165	-65.5%
Желчный пузырь	2.776	1.128	-59.4%
Легкое	1.856	0.793	-57.3%
Мышцы	0.521	0.341	-34.7%
Тимус	1.992	0.931	-53.3%

\* - % изменения=(SUV перед – SUV после)/SUV перед.

Пример 13. Авторадиография *in vitro* с макроциклическим PD-L1 пептидным радиотрассером, меченным [<sup>18</sup>F].

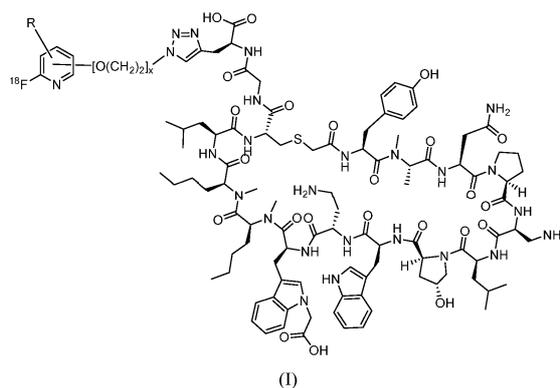
Опухолевые ткани легких человека помещали в ОСТ и охлаждали в 2-метилбутане в течение 2-5 мин до замораживания. Образцы хранили в морозильной камере с температурой -80°C до использования. В анализ также включали ткани ксенотрансплантата человека. Мышей, несущих двусторонние ксенотрансплантаты, получали путем введения  $2 \times 10^6$  клеток карциномы легкого человека hPD-L1(+) L2987 и  $4 \times 10^6$  клеток карциномы толстой кишки человека hPD-L1(-) HT-29 подкожно в противоположные стороны мыши. После того как полученные опухоли ксенотрансплантата достигли соответствующего размера (прибл. 200-300 мм<sup>3</sup>), мышей анестезировали 2% изофлураном и умерщвляли цервикальной дислокацией. Свежие опухолевые ткани вырезали, погружали в ОСТ и охлаждали в 2-метилбутане в течение 2-5 мин до замораживания. Затем ткани обертывали в фольгу/пакет ZIPLOC® и хранили при -80°C до использования. Для всех тканей (опухоли легких человека и ксенотрансплантаты) секции толщиной 5 мкм (собранные в виде 2 секций/слайд) разрезали с использованием криостата, оттаивали на стеклянных предметных слайдах микроскопа и давали высохнуть на воздухе в течение около 30 мин. Блокирующие исследования с холодным (немеченым) пептидом при 0,1, 1 и 10 нМ соответственно. Отдельные слайды, 1 слайд на концентрацию, переносили в инкубационные камеры для стеклянных слайдов для инкубации. Отдельно исходный раствор 0,25 нМ [<sup>18</sup>F]-(S)-2-(2-((6S,9S,12S,18R,21S,24S,27S,30S,-33S,36S,38aS,40R,44S,47S,49aS)-36-((1H-индол-3-ил)метил)-6-(2-амино-2-оксоэтил)-33-(2-аминоэтил)-47-(аминометил)-24,27-дибутил-30-((1-(карбоксиметил)-1H-индол-3-ил)метил)-40-гидрокси-12-(4-гидроксибензил)-21,44-диизобутил-9,10,25,28-тетраметил-5,8,11,14,20,23,26,29,32,35,38,43,46,49-тетрадекаоксогексатетраоктагидро-1H,5H-дипирроло [2,1-g1:2', 1'-x][1]тиа[4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43]-тетрадекаазациклопентатетраоктин-18-карбоксамидо)ацетамидо)-3-(1-(2-(2-(2-(2-(2-фторпиридин-3-ил)окси)этокси)этокси)этил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)пропановой кислоты получали путем разбавления 10,6 мкл исходного раствора радиолганда (7064 нМ во время эксперимента) 300 мл твин 80. Из этого исходного раствора в каждую инкубационную камеру добавляли 40 мл. Одна из этих камер содержала только буферный раствор радиолганда, который называется общей секцией связывания. Другие инкубационные камеры получали 40 мл этого исходного раствора вместе с соответствующей концентрацией блокирующего соединения (немеченого пептида при 0,1, 1 или 10 нМ). Слайды инкубировали в индивидуальных буферных растворах в течение 1 ч при комнатной температуре для достижения максимального связывания. После инкубации слайды из каждой обработанной группы удаляли из инкубационных растворов и помещали в ледяной промывочный буфер (Tween 80) на 3 мин и промывали 4 раза. Слайды затем сушили под потоком холодного воздуха в течение приблизительно 30 мин. Высушенные на воздухе слайды были выставлены на ночь при комнатной температуре с помещением их на пластину для визуализации (BAS-SR 3545S). Пластина для визуализации сканировали с использованием биоинженерного анализатора (Fujifilm Fluorescent Image Analyzer, FLA-9000). Размер пикселей изображений авторадиограммы составлял 100 мкм. Анализ изображений выполнялся с использованием программного обеспечения Multi-Gauge. Представляющие интерес области (ROI) были обведены так, чтобы окружить всю опухолевую ткань во всех исследуемых группах. Из этих ROI количественно оценивали сигналы авторадиографии связанной с тканями радиоактивности. Видимое смещение макроциклического PD-L1

пептидного радиотрасера, меченного [ $^{18}\text{F}$ ], по сравнению с общими секциями связывания определяли для 3 различных концентраций (0,1, 1 и 10 нМ) немеченого пептида как в секциях опухоли легкого человека, так и в секциях ксенотранспланта человека. Дозозависимое смещение макроциклического PD-L1 пептидного радиотрасера, меченного [ $^{18}\text{F}$ ], наблюдалось во всех секциях ткани с добавлением немеченого пептида (фиг. 4). Последовательные 5 мкм срезы ткани из каждой ткани подвергали иммуногистохимической процедуре против PD-L1 человека для того, чтобы проверить уровень экспрессии антигена PD-L1 в образцах, подтвержденных экспрессией PD-L1 в образцах легких человека.

Специалистам в данной области техники должно быть понятно или они будут способны установить, используя не более чем рутинные эксперименты, множество эквивалентов конкретных вариантов выполнения изобретения, описанного в данном документе. Такие эквиваленты предназначены для охвата следующей формулой изобретения.

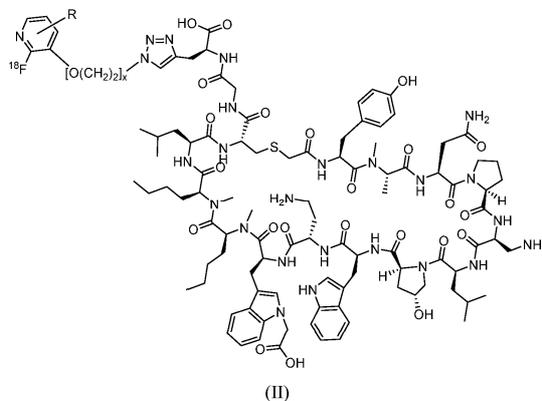
## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

### 1. Соединение формулы (I)



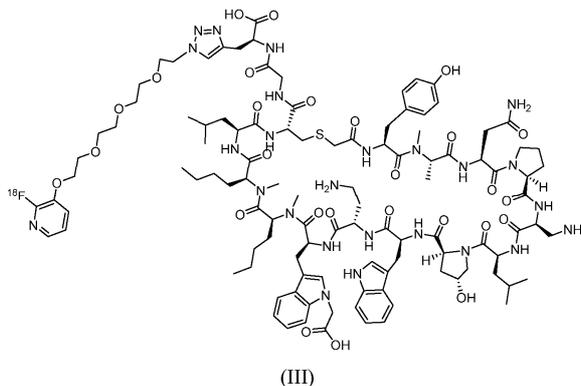
или его фармацевтически приемлемая соль, где x представляет собой целое число от 1 до 8, и R представляет собой  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$  алкильную группу.

### 2. Соединение по п.1 формулы (II)



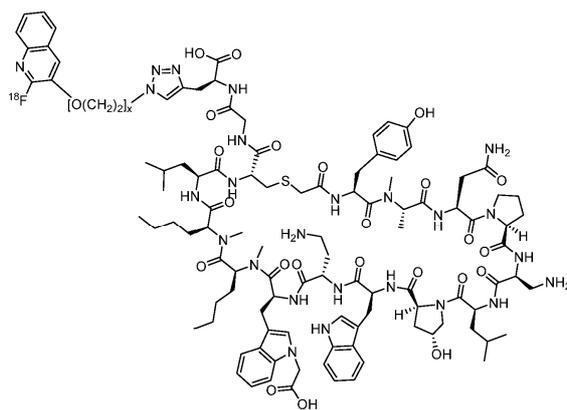
или его фармацевтически приемлемая соль, где x представляет собой целое число от 1 до 8, и R представляет собой  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$  алкильную группу.

### 3. Соединение по п.1 формулы (III)



или его фармацевтически приемлемая соль.

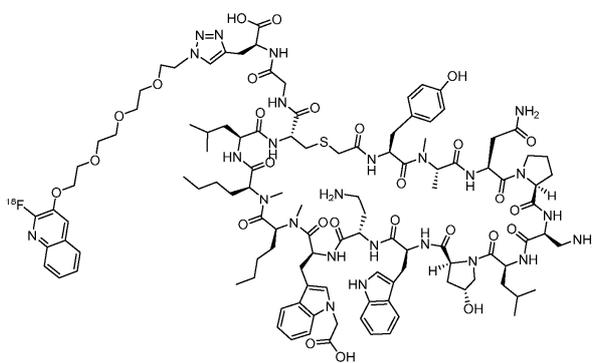
### 4. Соединение формулы (IV)



(IV)

или его фармацевтически приемлемая соль, где  $x$  представляет собой целое число от 1 до 8.

5. Соединение по п.4 формулы (V)



(V)

или его фармацевтически приемлемая соль.

6. Способ получения изображения распределения соединения по п.1, где способ включает:

- a) введение соединения по п.1 субъекту и
- b) визуализацию *in vivo* распределения соединения сканированием позитронно-эмиссионной томографией (PET).

7. Способ по п.6, где визуализированное распределение соединения по п.1 свидетельствует о наличии или отсутствии заболевания.

8. Способ мониторинга прогрессирования заболевания у субъекта, где способ включает:

- (a) введение субъекту, нуждающемуся в этом, соединения по п.1, которое связывается с целевой молекулой, ассоциированной с наличием заболевания, в первой точке времени и получение изображения по меньшей мере части субъекта для определения количества пораженных заболеванием клеток или тканей; и

- (b) введение субъекту соединения по п.1 в одну или несколько последующих точек времени и получение изображения по меньшей мере части субъекта в каждой точке времени; где размер и положение пораженных заболеванием клеток или тканей в каждой точке свидетельствуют о прогрессировании заболевания.

9. Способ количественного определения пораженных заболеванием клеток или тканей у субъекта, где способ включает:

- (a) введение субъекту, имеющему пораженные клетки или ткани, соединения по п.1, которое связывается с целевой молекулой, расположенной в пораженных заболеванием клетках или тканях; и

- (b) детектирование радиоактивных излучений  $^{18}\text{F}$  в пораженных заболеванием клетках или тканях, где уровень и распределение радиоактивных излучений в пораженных заболеванием клетках или тканях является количественным показателем пораженных заболеванием клеток или тканей.

10. Способ по п.9, где заболевание выбирается из группы, состоящей из солидных типов рака, гематопозитических типов рака, гематологических типов рака, аутоиммунного заболевания, нейродегенеративного заболевания, сердечно-сосудистого заболевания и патогенной инфекции.

11. Способ получения количественного изображения тканей или клеток, экспрессирующих PD-L1, где метод включает контактирование клеток или ткани с соединением по п.1, которое связывается с PD-L1, и детектирование или определение количества ткани, экспрессирующей PD-L1, с применением позитронно-эмиссионной томографии (PET).

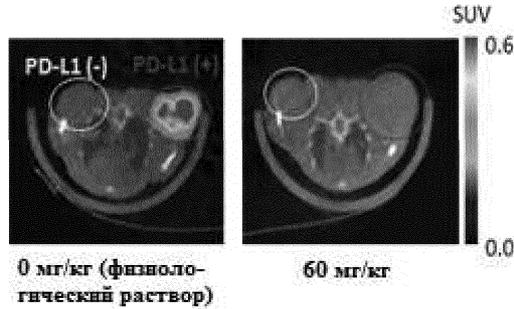
12. Способ скрининга агента для лечения заболевания, включающий стадии:

- (a) контактирование клеток, экспрессирующих PD-L1, с соединением по п.1, которое связывается с

PD-L1, в присутствии или в отсутствие агента-кандидата; и

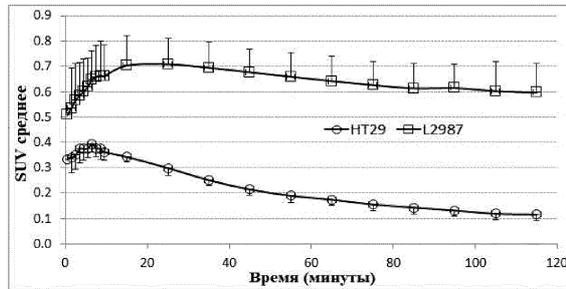
(b) визуализация клеток в присутствии или в отсутствие агента-кандидата с применением позитронно-эмиссионной томографии (PET), где уменьшение количества радиоактивных излучений в присутствии агента-кандидата свидетельствует о том, что агент связывается с PD-L1.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п.1 для количественного определения пораженных заболеванием клеток или тканей у субъекта, где заболевание выбирается из группы, состоящей из солидных типов рака, гематопозитических типов рака и гематологических типов рака.

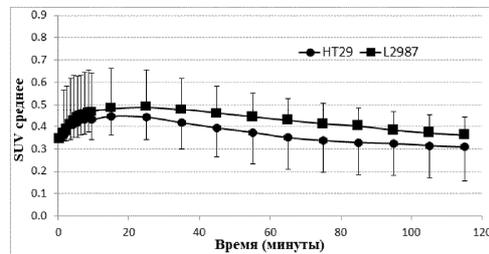


Фиг. 1

2А. Физиологический раствор (0 мг/кг связывающего PD-L1 макроциклического пептида)

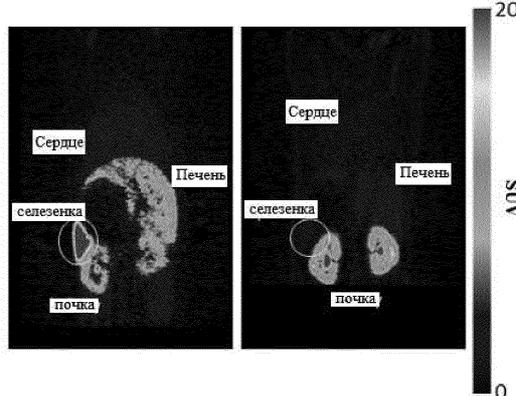


2В. Пре-доза 60 мг/кг связывающего PD-L1 макроциклического пептида

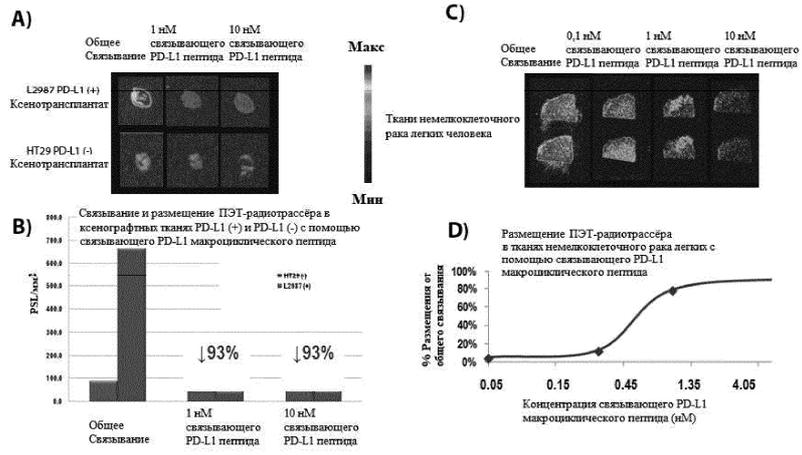


Фиг. 2

Исследование блокирования  
 Контроль: Пре-доза 2 мг/кг связывающего PD-L1 макроциклического пептида 120 минут перед инъекцией радиотрассера



Фиг. 3



Фиг. 4

