

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192045** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.10.27

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

(22) Дата подачи заявки
2020.01.30

(54) **СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ РАКОВОГО
ЗАБОЛЕВАНИЯ**

(31) 19154495.6

(32) 2019.01.30

(33) EP

(86) PCT/EP2020/052268

(87) WO 2020/157184 2020.08.06

(71) Заявитель:

**ТЕХНИШЕ УНИВЕРЗИТЕТ
МЮНХЕН; ТЕХНИШЕ
УНИВЕРЗИТЕТ МЮНХЕН -
КЛИНИКУМ РЕХТС ДЕР ИЗАР (DE)**

(72) Изобретатель:

**Вурцер Александер Йозеф, Вестер
Ханс-Йюрген, Айбер Маттиас
Иоганнес (DE)**

(74) Представитель:

**Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.,
Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)**

(57) Изобретение относится к конъюгату лиганд-SIFA-хелатор, содержащему в одной молекуле три отдельные группы: (a) один или несколько лигандов, которые способны связываться с PSMA, (b) фрагмент акцептора кремния-фторида (SIFA), который включает ковалентную связь между атомом кремния и атомом фтора, и (c) одну или несколько хелатных групп, содержащих хелатный нерадиоактивный катион.

A1

202192045

202192045

A1

СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

Настоящее изобретение относится к конъюгату лиганд-SIFA-хелатор, содержащему в одной молекуле: (a) один или более лигандов, способных связываться с PSMA, (b) фрагмент акцептора кремнефторида (SIFA), содержащий ковалентную связь между кремнием и атомом фтора, помеченный ^{18}F , и (c) одну или более хелатирующих групп, содержащих хелатированный нерадиоактивный катион.

В настоящей заявке цитируются документы, включая заявки на патенты и руководства производителей. Описания указанных документов полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки, но не препятствуют признанию патентоспособности настоящего изобретения. Более конкретно, все документы, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящую заявку посредством ссылки в той же степени, как если бы каждый отдельный документ был бы специально и индивидуально указан как включенный посредством ссылки.

Рак предстательной железы

Рак предстательной железы (РПЖ) в течение последних десятилетий оставался наиболее распространенным злокачественным заболеванием у мужчин с низкой частотой выживаемости. Простатический специфический мембранный антиген (PSMA) или глутаматкарбоксипептидаза II (GCP II) вследствие своей сверхэкспрессии при раке предстательной железы доказал свою пригодность в качестве отличной мишени для разработки высокочувствительных радиоактивно меченных агентов для эндордиотерапии и визуализации РПЖ. Простатический специфический мембранный антиген представляет собой внеклеточную гидролазу, каталитический центр которой содержит два иона цинка (II) с мостиковым гидроксидолигандом. Он сильно активирован в метастатических и гормонорезистентных карциномах предстательной железы, но также сообщалось о его физиологической экспрессии в почках, слюнных железах, тонком кишечнике, головном мозге и, в меньшей степени, также в здоровой ткани предстательной железы. В кишечнике PSMA облегчает абсорбцию фолиевой кислоты за счет преобразования птероилполи- γ -глутамата в птероилглутамат (фолат). В головном мозге он гидролизует N-ацетил-L-аспартил-L-глутамат (NAAG) до N-ацетил-L-аспартата и глутамата.

Простатический специфический мембранный антиген (PSMA)

Простатический специфический мембранный антиген (PSMA) представляет собой трансмембранный гликопротеин типа II, сверхэкспрессирующийся на эпителиальных

клетках рака предстательной железы. Несмотря на название, экспрессия PSMA также в разной степени обнаружена в неоваскулярной сети большого количества типов раковых заболеваний, не относящихся к раку предстательной железы. Среди наиболее распространенных типов раковых заболеваний, не относящихся к раку предстательной железы, демонстрирующих экспрессию PSMA, можно назвать карциному молочной железы, легкого, колоректальную и почечно-клеточную карциному.

Общие необходимые структуры молекул, нацеленных на PSMA, включают связывающую группу, содержащую цинк-связывающую группу (такую как мочевины, фосфинат или фосфорамидат), связанную с глутаматным фрагментом P¹, который гарантирует высокую аффинность и специфичность к PSMA и обычно дополнительно связан с эффекторной функциональностью. Эффекторная часть более гибкая и до некоторой степени толерантна к структурным модификациям. Входная воронка содержит две других важных для связывания лиганда структуры. Первая представляет собой аргининовый эпитоп, положительно заряженную область на стенке входной воронки и предпочтительно отрицательно заряженные функциональные группы в положении P1 PSMA исходя из механистического объяснения. Это, по-видимому, является причиной предпочтительного включения отрицательно заряженных остатков в лиганд-каркас. Насколько известно, углубленный анализ влияния положительных зарядов на лиганды PSMA до сих пор не был проведен. После связывания согласованное изменение положения боковых цепей аргинина может привести к открытию гидрофобного дополнительного кармана S1, второй важной структуры, которая, как было показано, вмещает йод-бензильную группу нескольких ингибиторов на основе мочевины, что способствует их высокой аффинности в отношении PSMA.

Zhang et al. обнаружили удаленный сайт связывания PSMA, который можно применять для бидентатного режима связывания (Zhang et al., *Journal of the American Chemical Society* 132, 12711-12716 (2010)). Так называемый сайт связывания арена представляет собой простой структурный мотив, образованный боковыми цепями Arg463, Arg511 и Trp541, и является частью входной крышки GCP II. Вовлечение сайта связывания арена дистальным фрагментом ингибитора может привести к значительному увеличению аффинности ингибитора к PSMA вследствие эффектов avidности. Таким образом PSMA I&T был разработан для взаимодействия с PSMA, хотя анализ кристаллической структуры режима связывания недоступен. Необходимая структура согласно Zhang et al. представляет собой линкерную группу (субериновая кислота в случае PSMA I&T), которая способствует открытой конформации входной крышки GCP II и тем самым делает возможным доступность сайта связывания арена. Кроме того, было показано, что

структурный состав линкера оказывает значительное влияние на нацеливание на опухоль и биологическую активность, а также на контраст визуализации и фармакокинетику, свойства, имеющие решающее значение как для высокого качества визуализации, так и для эффективной направленной эндоррадиотерапии.

В настоящее время в клинических условиях применяют две категории ингибиторов, нацеленных на PSMA. С одной стороны, есть меченные вещества с хелатирующими группами для комплексообразования радионуклидов, например, PSMA I&T или родственные соединения. С другой стороны, есть небольшие молекулы, включающие нацеливающую группу и эффекторные молекулы.

Введение метки ^{18}F

В последнее время несколько групп сосредоточили свое внимание на разработке новых ингибиторов на основе мочевины, меченных ^{18}F , для диагностики РПЖ. Меченный ^{18}F ингибитор PSMA на основе мочевины ^{18}F -DCFPyl продемонстрировал многообещающие результаты в обнаружении первичных и метастатических заболеваний. На основе структуры PSMA-617 недавно был разработан аналог PSMA-1007, меченный ^{18}F , показавший сопоставимое соотношение опухоль/орган.

Привлекательным подходом к внедрению меток ^{18}F является применение акцепторов кремнефторида (SIFA). Акцепторы кремнефторида описаны, например, в публикации Lindner et al., *Bioconjugate Chemistry* 25, 738-749 (2014). Чтобы сохранить связь кремнефторида, применение акцепторов кремнефторида приводит к необходимости создания стерически сложных групп вокруг атома кремния. Это, в свою очередь, делает акцепторы кремнефторида высоко гидрофобными. Что касается связывания с молекулой-мишенью, в частности с молекулой-мишенью, представляющей собой PSMA, гидрофобный фрагмент, обеспечиваемый акцептором кремнефторида, может быть применен для установления взаимодействий радиодиагностического или терапевтического соединения с гидрофобным карманом, как описано в публикации Zhang et al., *Journal of the American Chemical Society* 132, 12711-12716 (2010). Тем не менее, перед связыванием более высокая степень липофильности, введенная в молекулу, представляет серьезную проблему в отношении разработки радиофармацевтических препаратов с подходящим биораспределением *in vivo*, то есть низким неспецифическим связыванием в нецелевой ткани.

Неспособность решить проблему гидрофобности

Несмотря на многочисленные попытки, проблема гидрофобности, вызванная акцепторами кремнефторида, не была удовлетворительно решена в предшествующем уровне техники.

Например, Schirmacher E. et al. (Bioconjugate Chem. 2007, 18, 2085-2089) синтезировали различные ^{18}F -меченные пептиды, применяя высокоэффективный меченый синтон п-(ди-трет-бутилфторсилил)бензальдегид(^{18}F]SIFA-A), который является одним из примеров акцептора кремнефторида. Способ SIFA привел к неожиданно эффективному изотопному обмену ^{19}F - ^{18}F с получением ^{18}F -синтона в почти количественном выходе с высокой специфической активностью от 225 до 680 ГБк/мкмоль (6081–18378 Ки/ммоль) без применения очистки ВЭЖХ. В итоге, ^{18}F]SIFA-бензальдегид применяли для мечения N-концевых аминокси (N-AO) дериватизированных пептидов АО-Тур3-октреотат (АО-TATE), цикло(fK(AO-N)RGD) и N-AO-PEG₂-[D-Тур-Gln-Trp-Ala-Val-Ala-His-Thi-Nle-NH₂] (АО-BZH3, производное бомбезина) с высокими радиохимическими выходами. Тем не менее, меченые пептиды обладают высокой липофильностью (что можно определить по времени удерживания ВЭЖХ с применением условий, описанных в указанной публикации), и поэтому они не подходят для дальнейшей оценки на животных моделях или на людях.

В публикации Wängler C. et al. (Bioconjugate Chem., 2009, 20 (2), pp. 317-321) описано первое Kit-подобное радиофторирование белка (сывороточный альбумин крысы, RSA) на основе SIFA. В качестве маркирующего агента 4-(ди-трет-бутил ^{18}F]фторсилил)бензолтиол(^{18}F]FA-SH) получали простым изотопным обменом с радиохимическим выходом от 40 до 60% (RCY), и продукт связывали непосредственно с сывороточным альбумином, дериватизированным малеимидом, с общим RCY 12% в течение от 20 до 30 мин. Технически простая процедура мечения не требует каких-либо сложных процедур очистки и является прямым примером успешного применения химии Si- ^{18}F для визуализации *in vivo* с помощью ПЭТ. Кривые зависимости активности от времени и изображения μPET мышей показали, что большая часть активного вещества была локализована в печени, тем самым демонстрируя, что маркирующий агент слишком липофильный и направляет зонд *in vivo* на гепатобилиарную экскрецию и интенсивный печеночный метаболизм.

Wängler C. et al. (см. Bioconjug Chem. 2010 Dec 15, 21(12):2289-96) впоследствии попытались преодолеть главный недостаток способа SIFA, высокую липофильность полученных радиофармпрепаратов, путем синтеза и оценки новых аналогов SIFA-октреотата (SIFA-Тур3-октреотат, SIFA-Asn(AcNH- β -Glc)-Тур3-октреотат и SIFA-Asn(AcNH- β -Glc)-PEG-Тур3-октреотат). В указанных соединениях между пептидом и SIFA-фрагментом были введены гидрофильные линкеры и фармакокинетические модификаторы, то есть углевод и линкер PEG плюс углевод. В качестве меры липофильности конъюгатов определяли значение $\log P(\text{ow})$, которое составило 0,96 для

SIFA-Asn(AcNH- β -Glc)-PEG-Тур³-октреотата и 1,23 для SIFA-Asn(AcNH- β -Glc)-Тур³-октреотата. Эти результаты показывают, что высокая липофильность фрагмента SIFA может быть лишь частично компенсирована применением гидрофильных фрагментов. Первое исследование визуализации продемонстрировало чрезмерный печеночный клиренс/поглощение печенью и, таким образом, не было перенесено в первое исследование на людях.

В публикации Bernard-Gauthier et al. (Biomed Res Int.2014, 2014: 454503) описано большое количество различных видов SIFA, о которых сообщалось в литературе, начиная от небольших простетических групп и других соединений с низкой молекулярной массой до меченых пептидов и совсем недавно описанных молекул аффител. На основании этих данных проблема липофильности простетических групп на основе SIFA пока не решена, то есть способ снижения общей липофильности пептида, конъюгированного с SIFA, до log D ниже приблизительно -2,0, не описан.

В публикации Lindner S. et al. (Bioconjug Chem. 2014 Apr 16, 25 (4): 738-49) описано, что производные пегилированного бомбезина (PESIN) в качестве специфических лигандов рецептора GRP и пептиды RGD (однобуквенные коды для аргинин-глицин-аспарагиновой кислоты) в качестве специфических связывающих веществ $\alpha\beta 3$ были получены и помечены фрагментом акцептора кремнефторида (SIFA). Чтобы компенсировать высокую липофильность фрагмента SIFA, были введены различные модификации гидрофильной структуры, приводящие к снижению значений logD. SIFA-Asn(AcNH- β -Glc)-PESIN, SIFA-Ser(β -Lac)-PESIN, SIFA-Cya-PESIN, SIFA-LysMe₃-PESIN, SIFA- γ -карбоксо-d-Glu-PESIN, SIFA-Cya₂-PESIN, SIFA-LysMe₃- γ -карбоксо-d-Glu-PESIN, SIFA-(γ -карбоксо-d-Glu)₂-PESIN, SIFA-RGD, SIFA- γ -карбоксо-d-Glu-RGD, SIFA-(γ -карбоксо-d-Glu)₂-RGD, SIFA-LysMe₃- γ -карбоксо-d-Glu-RGD. Все эти пептиды, уже улучшенные и модифицированные с целью снижения липофильности, показали значение logD в диапазоне от +2 до -1,22.

Ввиду вышеизложенного техническая проблема, лежащая в основе настоящего изобретения, относится к обеспечению радиодиагностических средств, содержащих акцептор кремнефторида и в то же время характеризующихся благоприятными свойствами *in vivo*.

Как станет очевидно из нижеследующего, в настоящем изобретении обеспечены проверка и подтверждение принципа применения специфических конъюгатов, связывающихся с высокой аффинностью с простатическим специфическим мембранным антигеном (PSMA) в качестве мишени. Соответственно, дополнительная техническая проблема, лежащая в основе настоящего изобретения, состоит в обеспечении улучшенной

диагностики для медицинского показания, представляющего собой раковое заболевание, предпочтительно рак предстательной железы.

Объект настоящего изобретения решает указанные технические проблемы. Соответственно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к конъюгату лиганд-SIFA-хелатор, содержащему в одной молекуле: (a) один или более лигандов, способных связываться с PSMA, (b) фрагмент акцептора кремнефторида (SIFA), содержащий ковалентную связь между атомом кремния и атомом фтора, и который помечен ^{18}F , и (c) одну или более хелатирующих групп, содержащих хелатированный нерадиоактивный катион.

Конъюгат лиганд-SIFA-хелатор содержит три отдельных фрагмента. Три отдельных фрагмента представляют собой: (a) один или более лигандов, способных связываться с PSMA, (b) фрагмент акцептора кремнефторида (SIFA), содержащий ковалентную связь между кремнием и атомом фтора, и (c) одну или более хелатирующих групп, содержащих хелатированный нерадиоактивный катион.

Для диагностической визуализации атом фтора в фрагменте SIFA представляет собой ^{18}F . ^{18}F может быть введен изотопным обменом с ^{19}F .

Хотя определенные лиганды, способные связываться с молекулой-мишенью, имеющей отношение к заболеванию, могут быть циклическими пептидами, такие циклические пептиды не являются хелатирующими группами, как предусмотрено в настоящем документе, поскольку проблема гидрофобного фрагмента SIFA не решается в отсутствие дополнительного хелатирующего фрагмента. Таким образом, соединения по настоящему изобретению требуют гидрофильной хелатирующей группы в дополнение к лигандам, которые способны связываться с PSMA. Гидрофильная хелатирующая группа требуется для снижения гидрофобной природы соединений, вызванной присутствием фрагмента SIFA.

Лиганд применительно к первому аспекту настоящего изобретения определен в функциональном отношении. Это так, потому что настоящее изобретение не зависит от конкретной природы лиганда в структурном отношении. Скорее, ключевым аспектом настоящего изобретения является комбинация в пределах одной молекулы акцептора кремнефторида и хелатора или хелата. Эти два структурных элемента, SIFA и хелатор, проявляют пространственную близость. Предпочтительно кратчайшее расстояние между двумя атомами двух элементов менее или равно 25 Å, более предпочтительно менее 20 Å и еще более предпочтительно менее 15 Å. Альтернативно или дополнительно, предпочтительно, чтобы не более 25 ковалентных связей отделяли атом фрагмента SIFA

от атома хелатора, предпочтительно не более 20 химических связей и даже более предпочтительно не более 15 химических связей.

Катион в соответствии с пунктом (с) первого аспекта представляет собой нерадиоактивный катион. Предпочтительно нерадиоактивный катион металла. Примеры приведены ниже.

Как следствие, под условия первого аспекта подпадают конъюгаты, которые являются радиоактивно мечеными в фрагменте SIFA, а также молекулы, которые вовсе не имеют радиоактивной метки. В последнем случае хелатирующая группа может представлять собой либо комплекс холодного (нерадиоактивного) иона или может быть лишена какого-либо иона.

Авторами настоящего изобретения неожиданно обнаружено, что размещение акцептора кремнефторида в соседстве с гидрофильным хелатором, такими как, но не ограничиваясь ими, DOTAGA или DOTA, экранирует или эффективно компенсирует липофильность фрагмента SIFA до такой степени, что сдвигает общую гидрофобность соединения в диапазон, при котором соединение пригодно для введения *in vivo*.

Дополнительным преимуществом соединений, особенно соединений, нацеленных на PSMA, по настоящему изобретению является их неожиданно низкое накопление в почках мышей по сравнению с другими радиофармацевтическими препаратами, нацеленными на PSMA, такими как PSMA I&T. Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, можно сказать, что это комбинация структурного элемента SIFA с хелатором, которая обеспечивает неожиданное снижение накопления в почках.

В отношении липофильности/гидрофильности, значение $\log P$ (иногда также называемое значением $\log D$) представляет собой признанную меру в данной области техники.

Термин "липофильность" относится к способности растворяться или абсорбироваться в растворах липидов, или адсорбироваться на липидоподобной поверхности или матрице. Это означает предпочтение липидов (буквальное значение) или органических или неполярных жидкостей, или жидкостей, растворов или поверхностей с небольшим дипольным моментом по сравнению с водой. Термин "гидрофобность" используется в настоящем документе в эквивалентном значении. Прилагательные липофильный и гидрофобный используются в значении, соответствующем описанным выше существительным.

Массовый поток молекулы на границе раздела двух несмешивающихся или по существу несмешивающихся растворителей определяется ее липофильностью. Чем более липофильна молекула, тем более она растворима в липофильной органической фазе.

Коэффициент распределения молекулы, который наблюдается между водой и *n*-октанолом, был принят в качестве стандартной меры липофильности. Коэффициент распределения P вида A определяют, как отношение $P = [A]_{\text{н-октанол}}/[A]_{\text{вода}}$. Обычно указывается значение $\log P$, которое представляет собой логарифм коэффициента распределения. В случае, если молекула является ионизируемой, множество различных микровидов (ионизированные и неионизированные формы молекулы) в принципе будут присутствовать в обеих фазах. Величина, описывающая общую липофильность ионизируемого вида, представляет собой коэффициент распределения D , определяемый как отношение $D = [\text{сумма концентраций всех микровидов}]_{\text{н-октанол}}/[\text{сумма концентраций всех микровидов}]_{\text{вода}}$. Как и в случае с $\log P$, часто указывается логарифм коэффициента распределения, $\log D$. Часто буферную систему, такую как фосфатно-солевой буфер, применяют в качестве альтернативы воде в вышеописанном определении $\log P$.

Если липофильный характер заместителя в первой молекуле необходимо оценить и/или определить количественно, то можно оценить вторую молекулу, соответствующую такому заместителю, где указанная вторая молекула получена, например, путем разрыва связи, соединяющей указанный заместитель с остатком первой молекулы и соединяющей свободную(ые) валентность(и), полученную(ые) таким образом, с водородом(ами).

В качестве альтернативы, можно определить вклад заместителя в $\log P$ молекулы. Вклад $\pi_{X X}$ заместителя X в $\log P$ молекулы $R-X$ определяют, как $\pi_{X X} = \log P_{R-X} - \log P_{R-H}$, где $R-H$ представляет собой незамещенное исходное соединение.

Значения P и D больше единицы, а также значения $\log P$, $\log D$ и $\pi_{X X}$ больше нуля указывают на липофильный/гидрофобный характер, тогда как значения P и D меньше единицы, а также значения $\log P$, $\log D$ и $\pi_{X X}$ меньше нуля указывают на гидрофильный характер соответствующих молекул или заместителей.

Вышеописанные параметры, характеризующие липофильность липофильной группы или всей молекулы по настоящему изобретению, могут быть определены экспериментальными средствами и/или предсказаны вычислительными способами, известными в данной области техники (см., например, Sangster, Octanol-water Partition Coefficients: fundamentals and physical chemistry, John Wiley & Sons, Chichester (1997)).

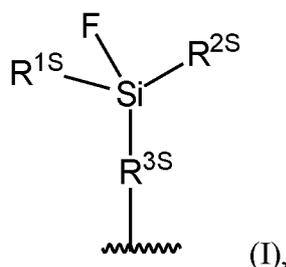
В предпочтительном варианте осуществления значение $\log P$ соединений по настоящему изобретению составляет от -5 до -1,5. Особенно предпочтительно значение $\log P$ составляет от -3,5 до -2,0.

В предпочтительном варианте осуществления лиганд по настоящему изобретению содержит или состоит из пептида, пептидомиметика или замещенной мочевины, заместителей, включая аминокислоты. Понятно, что лиганд, содержащий пептид или

пептидомиметик, также содержит непептидную и непептидомиметическую части. Что касается молекулярной массы, предпочтение отдается молекулярной массе ниже 15 кДа, ниже 10 кДа или ниже 5 кДа. Соответственно, небольшие белки также охватываются термином "лиганд". Молекулы-мишени особенным образом не ограничены и включают ферменты, рецепторы, эпитопы, переносчики, молекулы клеточной поверхности и белки внеклеточного матрикса. Предпочтительны мишени, относящиеся к заболеванию. Особенно предпочтительными являются мишени, имеющие причинно-следственные связи с данным заболеванием или имеющие высокую сверхэкспрессию при данном заболевании и/или ингибирование которых может вызвать положительный эффект у пациента, страдающего данным заболеванием. Лиганды предпочтительно представляют собой лиганды с высокой аффинностью с предпочтительной аффинностью, выраженной как IC_{50} , которая составляет менее 50 нмоль/л, менее 20 нмоль/л или менее 5 нмоль/л.

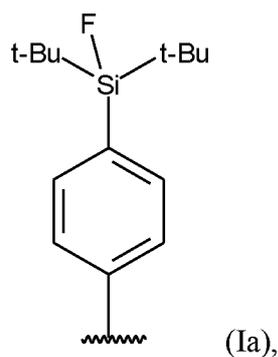
Особенно предпочтительны те лиганды, которые связываются с высокой аффинностью с простатическим специфическим мембранным антигеном (PSMA).

Фрагмент акцептора кремнефторида (SIFA) предпочтительно имеет структуру, представленную формулой (I):



где F представляет собой как ^{19}F , так и ^{18}F , $\text{R}^{1\text{S}}$ и $\text{R}^{2\text{S}}$ независимо представляют собой линейную или разветвленную C3-C10 алкильную группу, предпочтительно $\text{R}^{1\text{S}}$ и $\text{R}^{2\text{S}}$ выбраны из изопропила и трет-бутила, и более предпочтительно $\text{R}^{1\text{S}}$ и $\text{R}^{2\text{S}}$ представляют собой трет-бутил, $\text{R}^{3\text{S}}$ представляет собой C1-C20 углеводородную группу, которая может содержать одно или более ароматических и одно или более алифатических звеньев и/или до 3 гетероатомов, выбранных из O и S, предпочтительно $\text{R}^{3\text{S}}$ представляет собой C6-C10 углеводородную группу, которая содержит ароматическое кольцо и которая может содержать одну или более алифатических звеньев, более предпочтительно $\text{R}^{3\text{S}}$ представляет собой фенильное кольцо и наиболее предпочтительно $\text{R}^{3\text{S}}$ представляет собой фенильное кольцо, где Si-содержащий заместитель и связь, обозначенная как ~~~~~, находятся в пара-положении, и где фрагмент SIFA присоединен к остальной части конъюгата через связь, обозначенную как ~~~~~.

Более предпочтительно, фрагмент акцептора кремнефторида (SIFA) имеет структуру, представленную формулой (Ia):



где t-Bu представляет собой трет-бутильную группу,
и F представляет собой как ^{19}F , так и ^{18}F .

Предпочтительная хелатирующая группа содержит по меньшей мере одно из следующих (i), (ii) или (iii).

(i) Макроциклическую кольцевую структуру, имеющую от 8 до 20 кольцевых атомов, из которых 2 или более, более предпочтительно 3 или более, выбраны из атомов кислорода или атомов азота. Предпочтительно, 6 или менее кольцевых атомов выбраны из атомов кислорода или атомов азота. Особенно предпочтительно, 3 или 4 кольцевых атома представляют собой атомы азота или кислорода. Среди атомов кислорода и азота предпочтение отдается атомам азота. В комбинации с макроциклической кольцевой структурой предпочтительная хелатирующая группа может включать 2 или более, например, от 2 до 6, предпочтительно от 2 до 4 карбоксильных групп и/или гидроксильных групп. Среди карбоксильных групп и гидроксильных групп предпочтение отдается карбоксильным группам.

(ii) Ациклическую хелатирующую структуру с открытой цепью, имеющую от 8 до 20 атомов основной цепи (остова), из которых 2 или более, более предпочтительно 3 или более представляют собой гетероатомы, выбранные из атомов кислорода или атомов азота. Предпочтительно, 6 или менее атомов остова выбраны из атомов кислорода или атомов азота. Среди атомов кислорода и азота предпочтение отдается атомам азота. Более предпочтительно, хелатирующая структура с открытой цепью представляет собой структуру, которая содержит комбинацию из 2 или более, более предпочтительно 3 или более гетероатомов, выбранных из атомов кислорода или атомов азота, и 2 или более, например, от 2 до 6, предпочтительно от 2 до 4, карбоксильные группы и/или гидроксильные группы. Среди карбоксильных групп и гидроксильных групп предпочтение отдается карбоксильным группам.

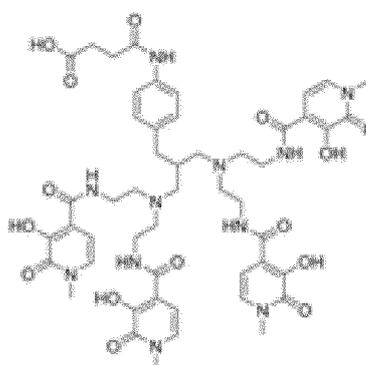
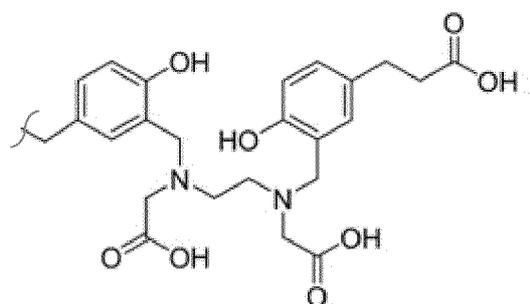
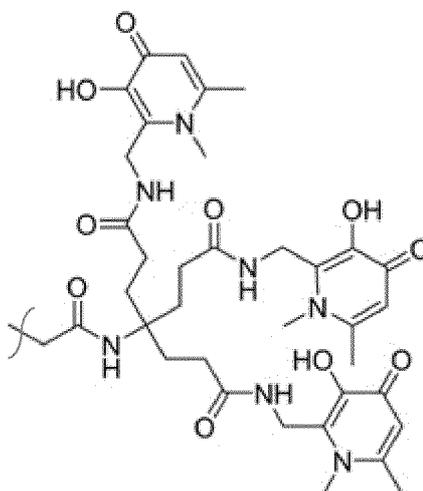
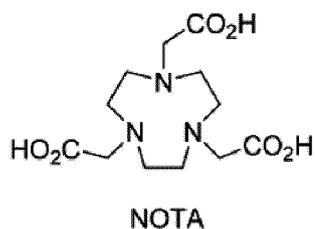
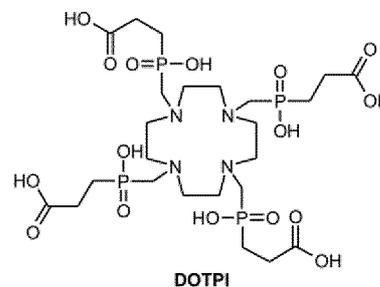
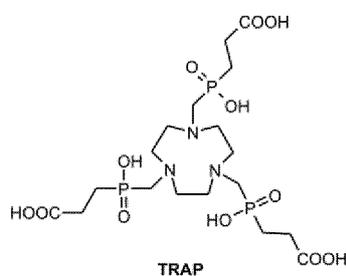
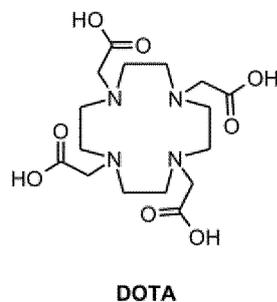
(iii) Разветвленную хелатирующую структуру, содержащую четвертичный атом углерода. Предпочтительно четвертичный атом углерода замещен 3 идентичными

хелатирующими группами в дополнение к фрагменту SIFA/лиганд. Замещенные хелатирующие группы могут включать амид. Замещенные хелатирующие группы могут включать ароматическую группу. Замещенные хелатирующие группы могут включать гидроксипиридинон.

В предпочтительных конкретных примерах хелатирующая группа представляет собой остаток хелатирующего агента, выбранного из бис(карбоксиметил)-1,4,8,11-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекана (CBTE2a), циклогексил-1,2-диаминтетрауксусной кислоты (CDTA), 4-(1,4,8,11-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекан-1-ил)метилбензойной кислоты (CPTA), N'-[5-[ацетил(гидрокси)амино]пентил]-N-[5-[[4-[5-аминопентил(гидрокси)амино]-4-оксобутаноил]амино]пентил]-N-гидроксипентандиамида (DFO), 4,11-бис(карбоксиметил)-1,4,8,11-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекана (DO2A), 1,4,7,10-тетрациклододекан-N,N',N'',N'''- тетрауксусной кислоты (DOTA), α -(2-карбоксиэтил)-1,4,7,10-тетраазабициклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты (DOTAGA), 1,4,7,10-тетраазабициклододекан-N,N',N'',N'''-1,4,7,10-тетра(метилен)фосфоновой кислоты (DOTMP), N,N'-дипиридоксилэтилендиамин-N,N'-диацетат-5,5'-бис(фосфата) (DPDP), диэтилентриамин-N,N',N''-пента(метилен)фосфоновой кислоты (DTMP), диэтилентриаминпентауксусной кислоты (DTPA), этилендиамин-N,N'-тетрауксусной кислоты (EDTA), этиленгликоль-O,O-бис(2-аминоэтил)-N,N',N''- тетрауксусной кислоты (EGTA), N,N-бис(гидроксибензил)этилендиамин-N,N'-диуксусной кислоты (HBED), гидроксиэтилендиаминтриуксусной кислоты (HEDTA), 1-(п-нитробензил)-1,4,7,10-тетраазабициклододекан-4,7,10-триацетата (HP-DOA3), 6-гидразинил-N-метилпиридин-3-карбоксамид (HYNIC), тетра-3-гидрокси-N-метил-2-пиридинон хелаторов (4-((4-(3-(бис(2-(3-гидрокси-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-4-карбоксамидо)этил)амино)-2-((бис(2-(3-гидрокси-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-4-карбоксамидо)этил)амино)метил)пропил)фенил)амино)-4-оксобутановой кислоты, сокращенно Me-3,2-НОРО, 1,4,7-триазабициклононан-1-янтарная кислота-4,7-диуксусной кислоты (NODASA), 1-(1-карбокси-3-карбоксипропил)-4,7-(карбокси)-1,4,7-триазабициклононана (NODAGA), 1,4,7-триазабициклононантриуксусной кислоты (NOTA), 4,11-бис(карбоксиметил)-1,4,8,11-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекана (TE2A), 1,4,8,11-тетраазабициклододекан-1,4,8,11-тетрауксусной кислоты (TETA), трис(гидроксипиридинона) (THP), терпиридин-бис(метиленаминтетрауксусной кислоты (TMT), 1,4,7-триазабициклононан-1,4,7-трис[метилен(2-карбоксиэтил)фосфиновой кислоты] (TRAP), 1,4,7,10-тетраазабициклододекан-N,N',N'',N'''-тетрауксусной кислоты (TRITA), 3-[[4,7-бис[[2-карбоксиэтил(гидрокси)фосфорил]метил]-1,4,7-триазонан-1-ил]метилгидроксифосфорил]пропановой кислоты и триэтилентетраамингексауксусной

кислоты (ТТНА), остаток которых обеспечивается ковалентным связыванием карбоксильной группы, содержащейся в хелатирующем агенте, с остальной частью конъюгата через сложноэфирную или амидную связь.

Конкретные хелаторы представлены ниже:



Среди приведенных выше примеров хелатирующих агентов особое предпочтение отдается хелатирующему агенту, выбранному из TRAP, DOTA и DOTAGA.

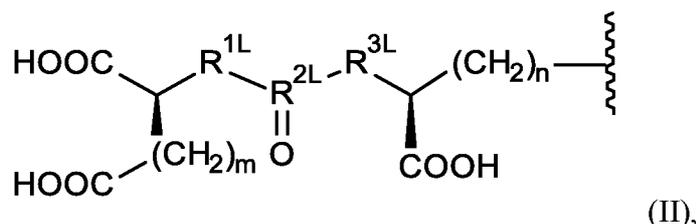
Хелатирующие металлы или катионы макроциклические и ациклические соединения хорошо известны в данной области техники и доступны от ряда производителей. Хотя хелатирующий фрагмент по настоящему изобретению конкретно не ограничен, понятно, что специалист может применять различные фрагменты в готовом виде без дополнительной обработки.

Хелатирующая группа может включать хелатированный катион, который не является радиоактивным.

Предпочтительные примеры катионов, которые могут быть хелатированы хелатирующей группой, представляют собой нерадиоактивные катионы Sc, Cr, Mn, Co, Fe, Ni, Cu, Ga, Zr, Y, Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, In, Sn, Te, Pr, Pm, Tb, Sm, Gd, Tb, Ho, Dy, Er, Yb, Tm, Lu, Re, Pt, Hg, Au, Pb, At, Bi, Ra, Ac, Th, более предпочтительно катионы Sc, Cu, Ga, Y, In, Tb, Ho, Lu, Re, Pb, Bi, Ac, Th и Er. Катион может представлять собой Ga. Катион может представлять собой Lu.

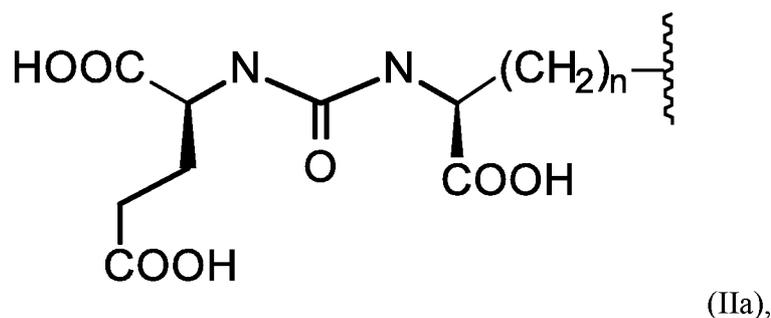
Соответственно, лиганд предпочтительно способен связываться с простатическим специфическим мембранным антигеном (PSMA).

Более предпочтительно лиганд имеет структуру, представленную формулой (II):



где m равно целому числу от 2 до 6, предпочтительно от 2 до 4, более предпочтительно 2, n равно целому числу от 2 до 6, предпочтительно от 2 до 4, более предпочтительно от 2 до 3, R^{1L} представляет собой CH_2 , NH или O , предпочтительно NH , R^{3L} представляет собой CH_2 , NH или O , предпочтительно NH , R^{2L} представляет собой C или $P(OH)$, предпочтительно C , и где лиганд присоединен к остальной части конъюгата через связь, обозначенную как \sim .

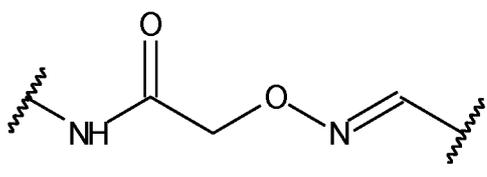
Лиганд может иметь структуру, представленную формулой (IIa):



олиго(сложный эфир-амида), олиго(сложный тиоэфир-амида), олиго(мочевина-амида), олиго(эфир-тиоэфира), олиго(эфир-сложного эфира), олиго(эфир-сложного тиоэфира), олиго(эфир-мочевины), олиго(тиоэфир-сложного эфира), олиго(тиоэфир-сложного тиоэфира), олиго(тиоэфир-мочевины), олиго(сложный эфир-сложного тиоэфира), олиго(сложный эфир-мочевины) и олиго(сложный тиоэфир-мочевины), предпочтительно со структурой, выбранной из олигоамида и олиго(сложный эфир-амида).

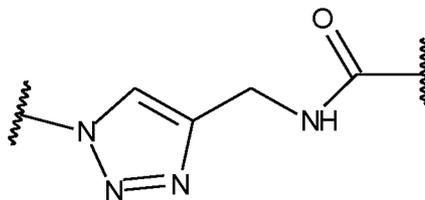
L^1 может быть необязательно замещен одним или более заместителями, независимо выбранными из $-OH$, $-OCH_3$, $-COOH$, $-COOCH_3$, NH_2 и $NHC(NH)NH_2$.

X^3 выбран из амидной связи и сложноэфирной связи, простого эфира, амина и линкерной группы формулы:

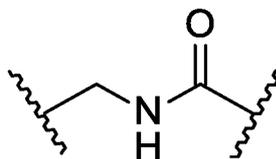


где связь, обозначенная как  в группе NH, связана с R^B , а другая связь, обозначенная как , связана с SIFA, предпочтительно X^3 представляет собой амидную связь, R^B представляет собой трехвалентную линкерную группу.

X^4 выбран из амидной связи, простой эфирной связи, тиоэфирной связи и сложноэфирной связи, сложной тиоэфирной связи, мочевиного мостика, аминной связи, линкерной группы формулы:



где амидная связь, обозначенная как , образована с хелатирующей группой, и другая связь, обозначенная как , связана с R^B и линкерной группой формулы:



где связь, обозначенная как , на карбонильном конце, образована с хелатирующей группой, и другая связь, обозначенная как , связана с R^B , предпочтительно X^4 представляет собой амидную связь.

R^{CH} представляет собой хелатирующую группу, содержащую хелатированный нерадиоактивный катион, предпочтительно нерадиоактивный катион металла, где

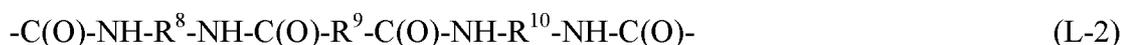
предпочтительные варианты осуществления указанной хелатирующей группы и необязательного хелатированного катиона являются такими, как определено выше.

Термин "олиго", в контексте олигоамида, олигоэфира, олиготиоэфира, сложного олигоэфира, сложного олиготиоэфира, олигомочевины, олиго(эфир-амида), олиго(тиоэфир-амида), олиго(сложный эфир-амида), олиго(сложный тиоэфир-амида), олиго(мочевина-амида), олиго(эфир-тиоэфира), олиго(эфир-сложного эфира), олиго(эфир-сложного тиоэфира), олиго(эфир-мочевины), олиго(тиоэфир-сложного эфира), олиго(тиоэфир-сложного тиоэфира), олиго(тиоэфир-мочевины), олиго(сложный эфир-сложного тиоэфира), олиго(сложный эфир-мочевина) и олиго(сложный тиоэфир-мочевина) предпочтительно следует понимать как относящиеся к группе, где от 2 до 20, более предпочтительно от 2 до 10 субъединиц связаны типом связей, указанный на тех же условиях. Как будет понятно специалисту в данной области техники, где в скобках указаны два разных типа связей, оба типа связей содержатся в рассматриваемой группе (например, в "олиго(сложный эфир-амид)" содержатся сложноэфирные связи и амидные связи).

Предпочтительно, L^1 содержит всего от 1 до 5, более предпочтительно всего от 1 до 3 и наиболее предпочтительно всего 1 или 2 амидных и/или сложноэфирных связей, предпочтительно амидных связей, в пределах своей основной цепи.

Термин олигоамид, таким образом, описывает фрагмент, имеющий цепь групп CH_2 или CHR , перемежающихся с группами, выбранными из $NHCO$ или $CONH$. В каждом случае R -фрагмент является необязательным заместителем, выбранным из $-OH$, $-OCH_3$, $-COOH$, $-COOCH_3$, NH_2 и $NHC(NH)NH_2$.

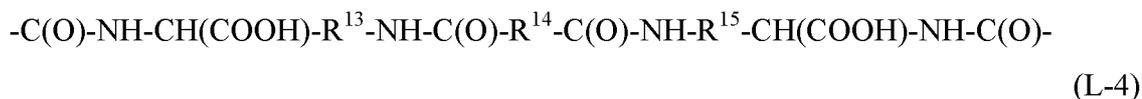
Также предпочтительно, $-X^1-L^1-X^2-$ представляет собой одну из следующих структур (L-1) и (L-2):



где $R^6 - R^{10}$ независимо выбраны из C2-C10 алкилена, предпочтительно линейного C2-C10 алкилена, где каждая из указанных алкиленовых групп может быть замещена одним или более заместителями, независимо выбранными из $-OH$, $-OCH_3$, $-COOH$, $-COOCH_3$, $-NH_2$ и $-NHC(NH)NH_2$.

Особенно предпочтительно, общее количество атомов углерода в R^6 и R^7 составляет от 4 до 20, более предпочтительно от 4 до 16, без атомов углерода, содержащихся в необязательных заместителях. Особенно предпочтительно, общее количество атомов углерода $R^8 - R^{10}$ составляет от 6 до 20, более предпочтительно от 6 до 16, без атомов углерода, содержащихся в необязательных заместителях.

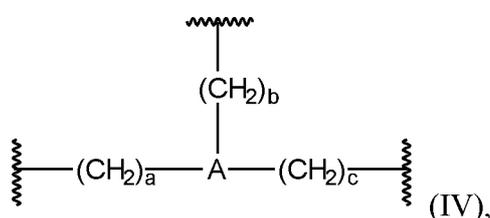
Особенно предпочтительно, $-X^1-L^1-X^2-$ представляет собой одну из следующих структур (L-3) и (L-4):



где $R^{11} - R^{15}$ независимо выбраны из C2-C8 алкилена, предпочтительно линейного C2-C8 алкилена.

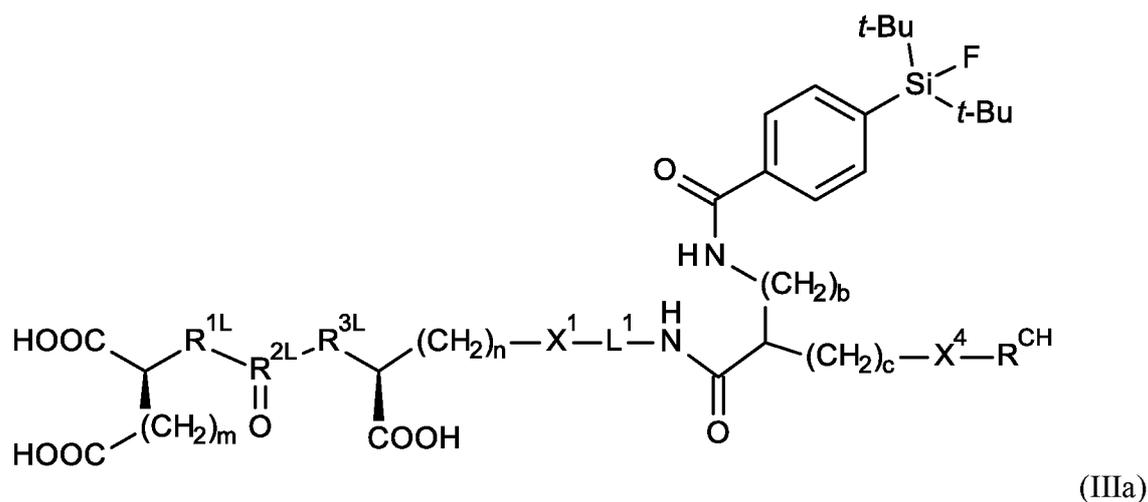
Особенно предпочтительно, общее количество атомов углерода в R^{11} и R^{12} или $R^{13} - R^{15}$, соответственно, составляет от 8 до 18, более предпочтительно от 8 до 12, еще более предпочтительно от 9 до 10.

Предпочтительно R^B имеет структуру, представленную формулой (IV):



где: A выбран из N, CR^{16} , где R^{16} представляет собой H или C1-C6 алкил, и 5-7-членной карбоциклической или гетероциклической группы, предпочтительно A выбран из N и CH, и более предпочтительно A представляет собой CH, связь, обозначенную как ~~~~~ в $(CH_2)_a$, образованную с X_2 , и a равно целому числу от 0 до 4, предпочтительно 0 или 1 и наиболее предпочтительно 0, связь, обозначенную как ~~~~~ в $(CH_2)_b$, образованную с X^3 , и b равно целому числу от 0 до 4, предпочтительно от 0 до 2 и более предпочтительно 0 или 1, и связь, обозначенную как ~~~~~ в $(CH_2)_c$, образованную с X^4 , и c равно целому числу от 0 до 4, предпочтительно от 0 до 2 и более предпочтительно 0 или 1.

Еще более предпочтительно, конъюгат по настоящему изобретению представляет собой соединение формулы (IIIa):



или его фармацевтически приемлемую соль, где m , n , R^{1L} , R^{2L} , R^{3L} , X^1 , L^1 , b , c , X^4 и R^{CH} являются такими, как определено выше, включая все их предпочтительные варианты осуществления.

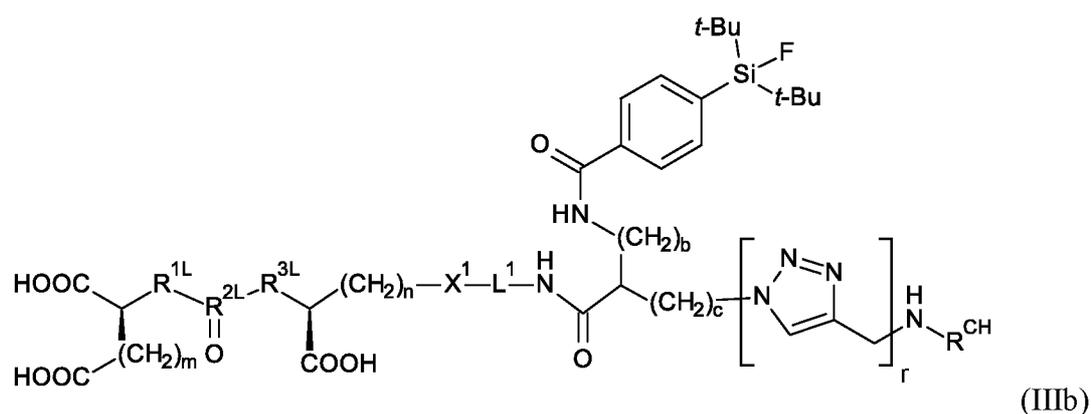
Для соединения формулы (IIIa) предпочтительно $b + c \geq 1$.

Для соединения формулы (IIIa) также предпочтительно $b + c \leq 3$.

Для соединения формулы (IIIa) более предпочтительно b равно 1, и c равно 0.

Для соединения формулы (III) также предпочтительно $-X^4-R^{CH}$ представляет собой остаток хелатирующего агента, выбранного из DOTA и DOTAGA, связанный с одной из его карбоксильных групп через амидную связь с остальной частью конъюгата.

В предпочтительном варианте осуществления соединения формулы (III), указанное соединение представляет собой соединение формулы (IIIb):



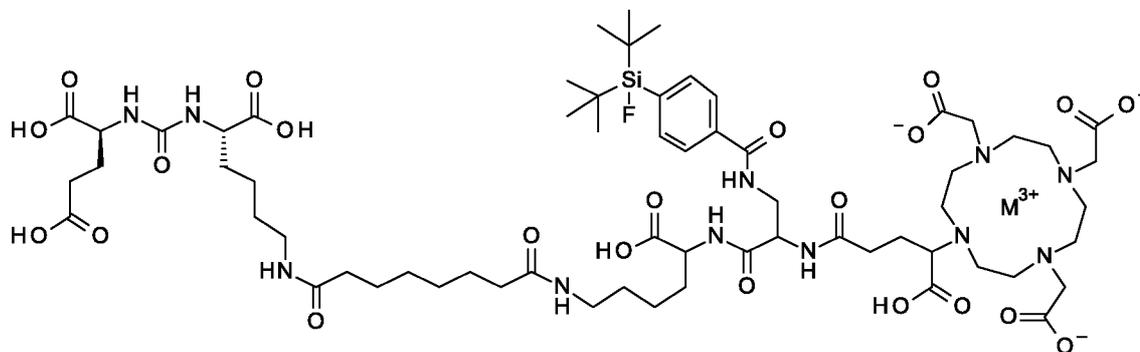
или его фармацевтически приемлемую соль, где m , n , R^{1L} , R^{2L} , R^{3L} , X^1 , L^1 , b , c , X^4 и R^{CH} являются такими, как определено выше, и g равно 0 или 1.

Особенно предпочтительно, $-N(H)-R^{CH}$ представляет собой остаток хелатирующего агента, выбранного из DOTA и DOTAGA, связанный с одной из его карбоксильных групп через амидную связь с остальной частью конъюгата.

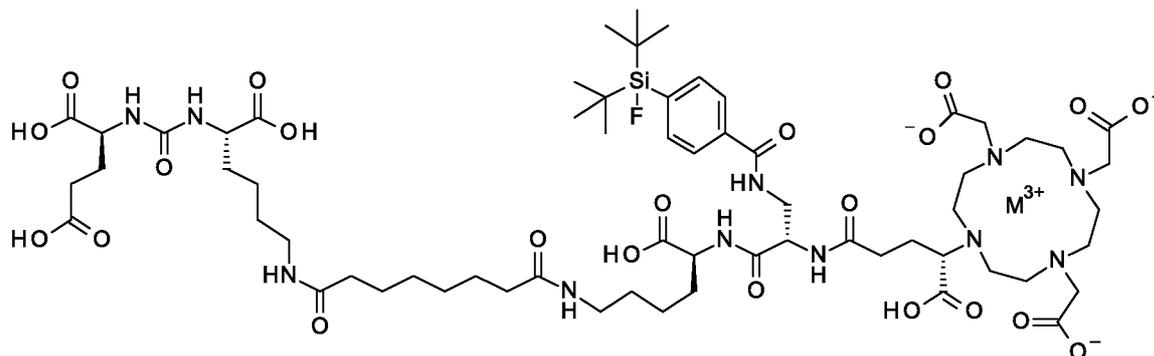
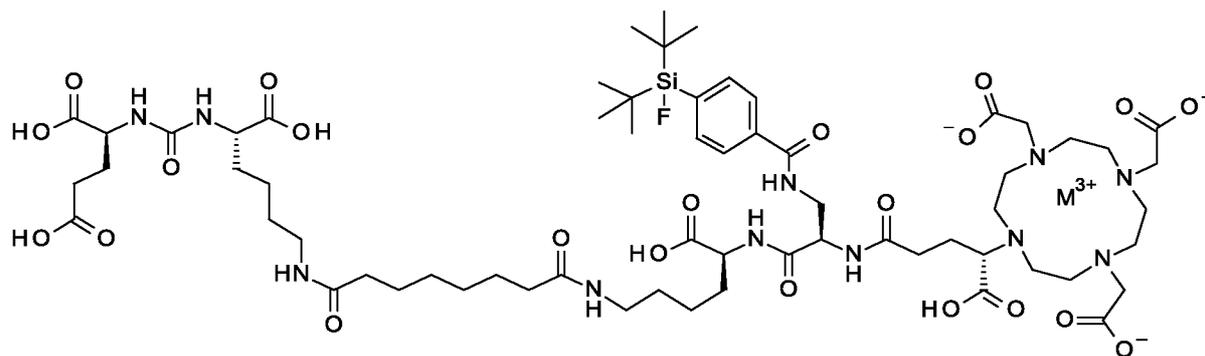
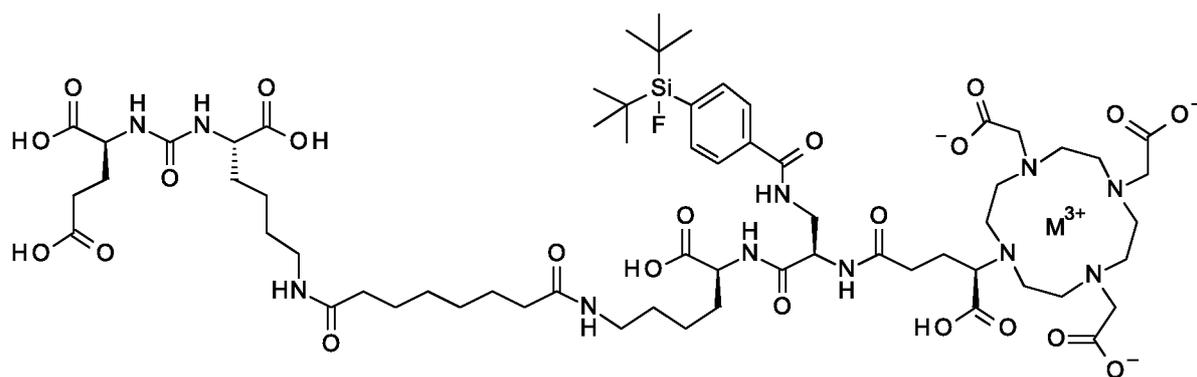
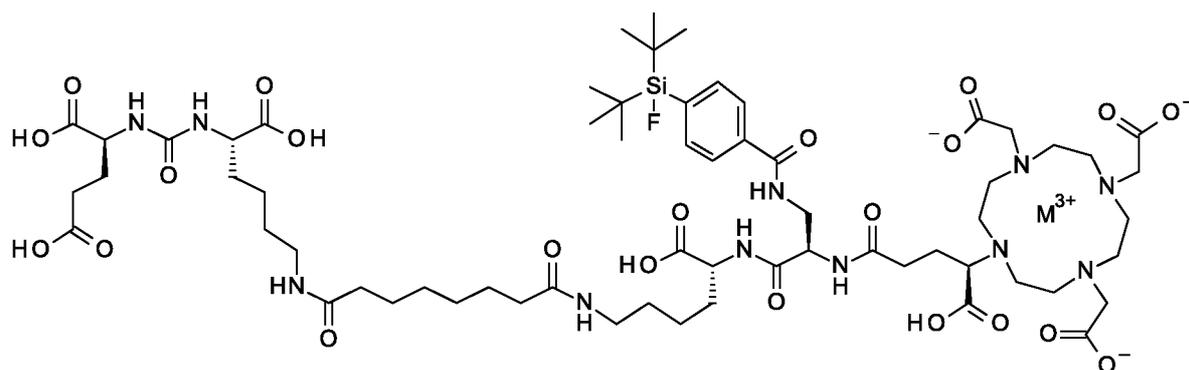
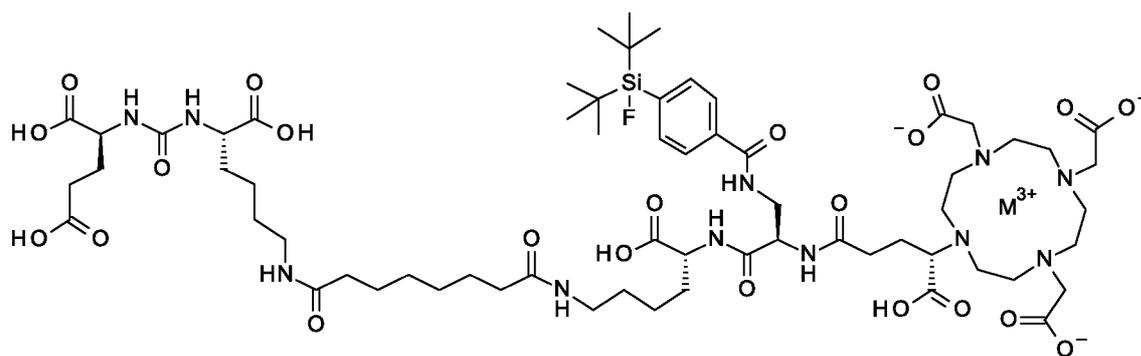
Для применения в ПЭТ-визуализации соединениям требуется позитронно-активный атом. Соединения включают ^{18}F для медицинского применения. Наиболее предпочтительные соединения по настоящему изобретению представляют собой соединения, где F включает ^{18}F и M^{3+} относится к нерадиоактивному катиону металла.

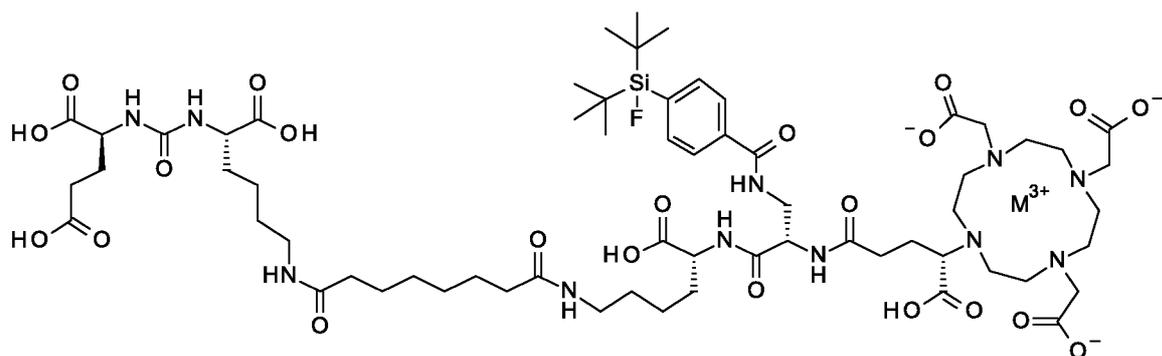
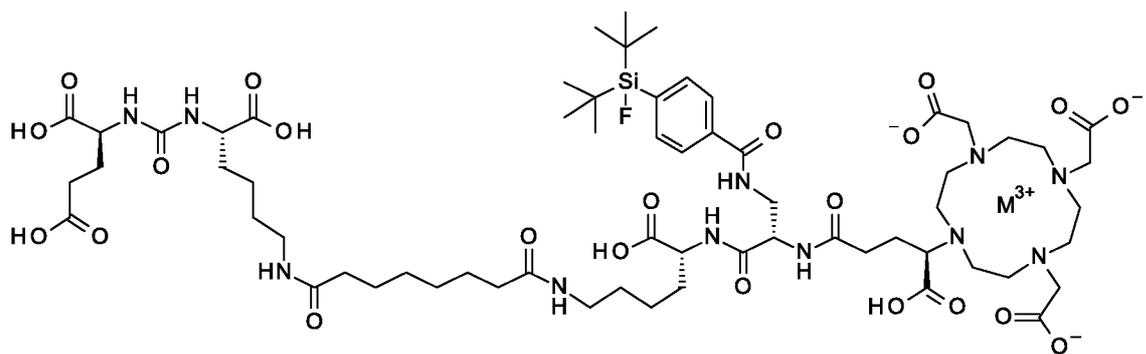
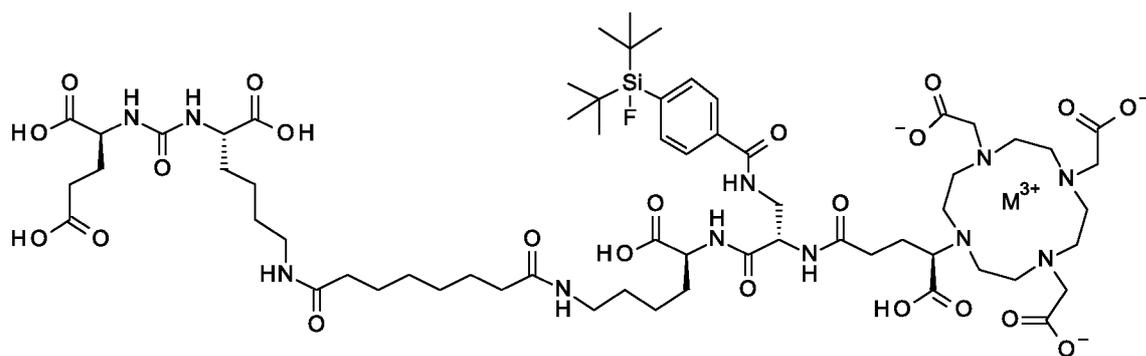
В соединениях по настоящему изобретению нерадиоактивный катион металла M может быть хелатирован с одной или более группами COO^- . M может быть хелатирован с одним или более атомами N. M может быть хелатирован с одним или более атомами N или одной или более группами COO^- . M может быть хелатирован с одним или более атомами N и одной или более группами COO^- . Там, где показан хелатированный нерадиоактивный катион металла M, кислотные группы, с которыми он хелатирован, обозначены просто как COO^- , эквивалентная четвертая кислота также может быть частично хелатирована и, следовательно, не может буквально представлять собой COOH .

PSMA-SIFA1 (5)

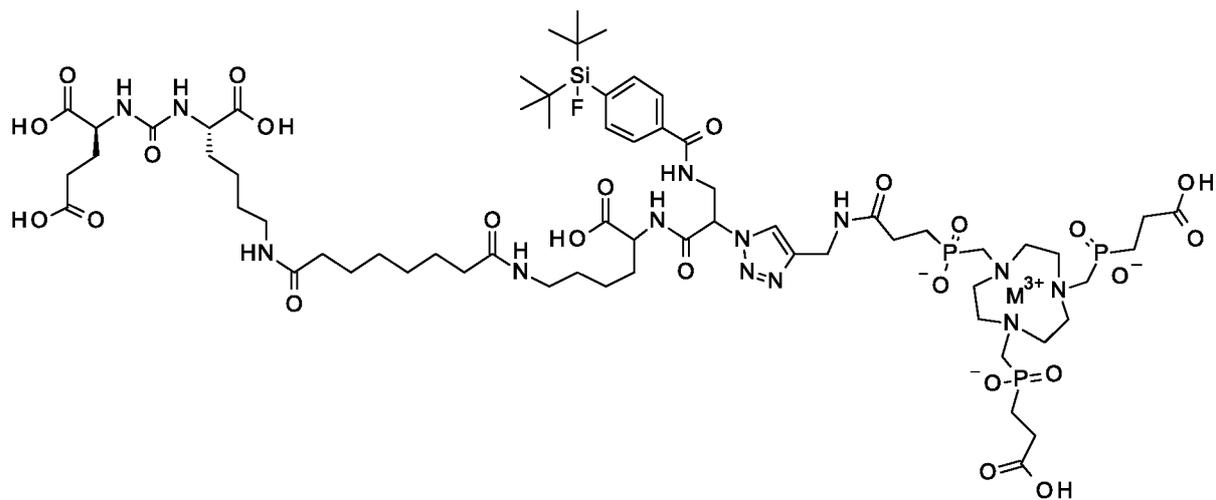


и их изомеры:

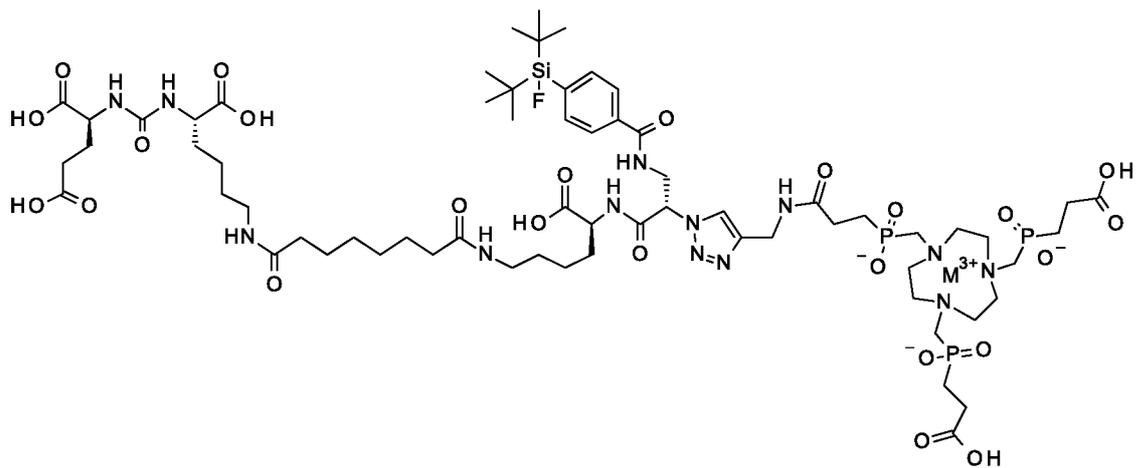
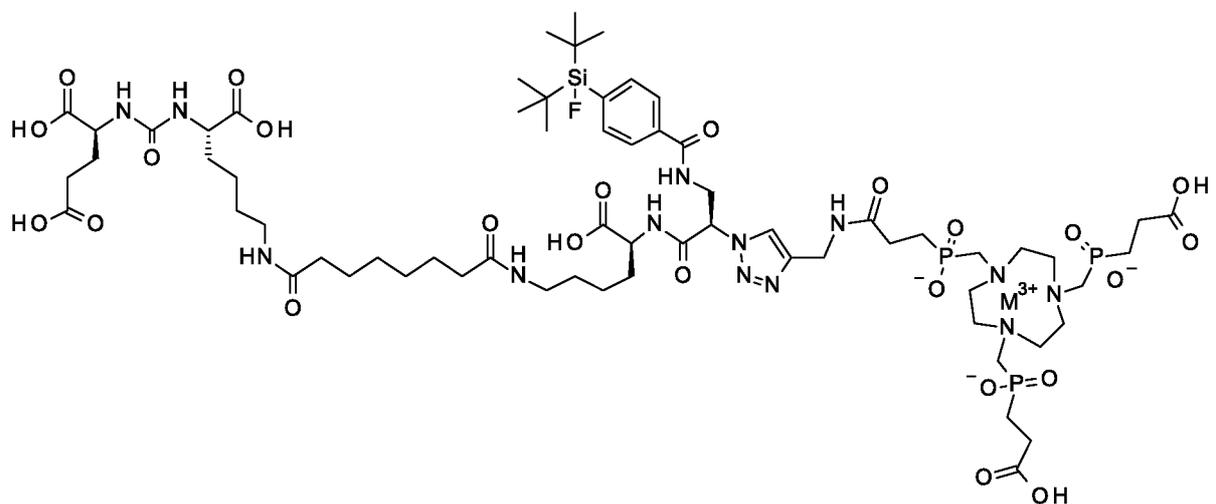


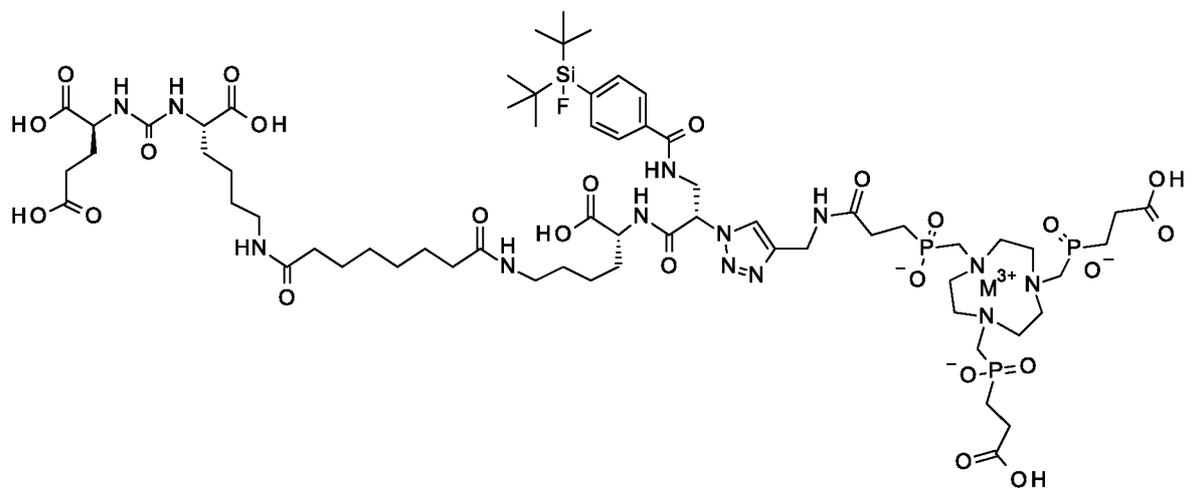
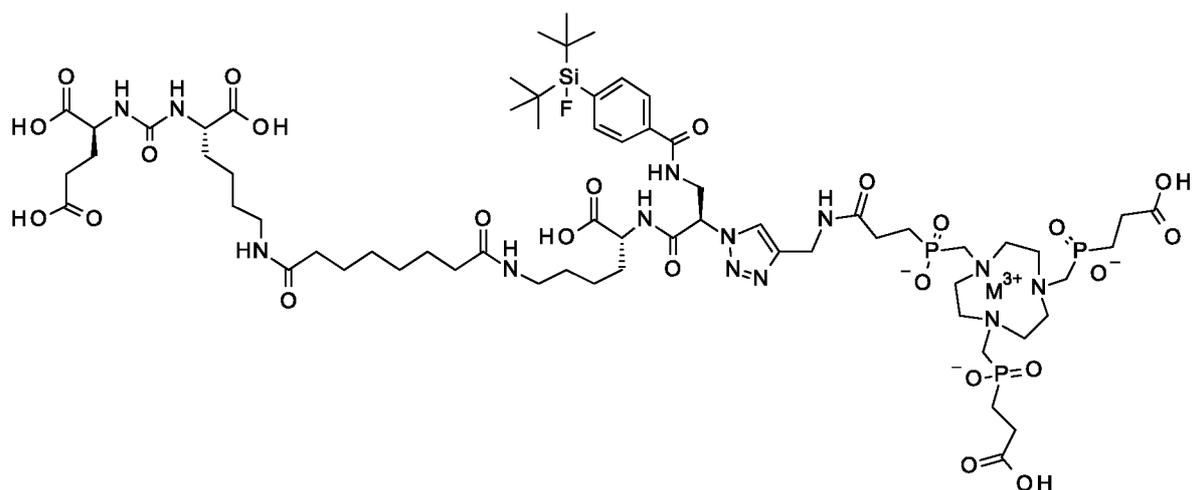


PSMA-SIFA2 (6)

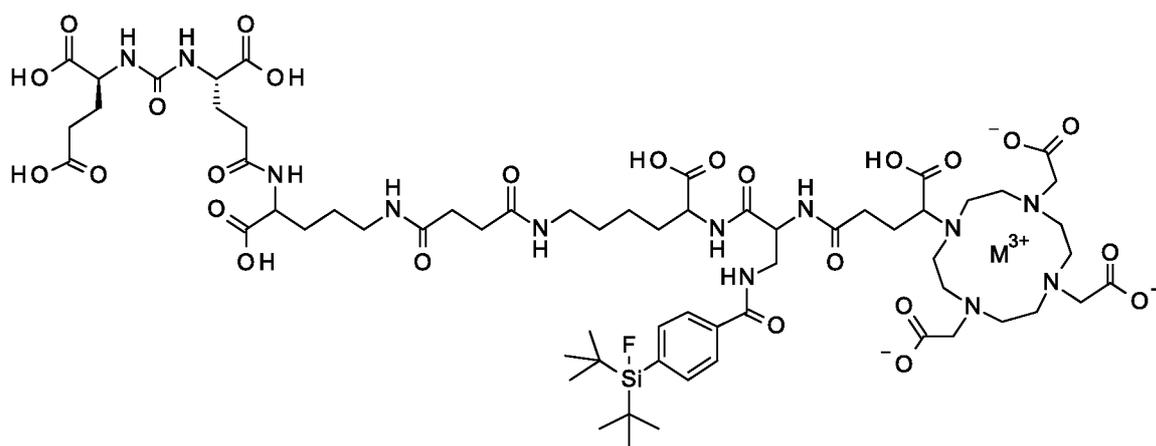


и их изомеры

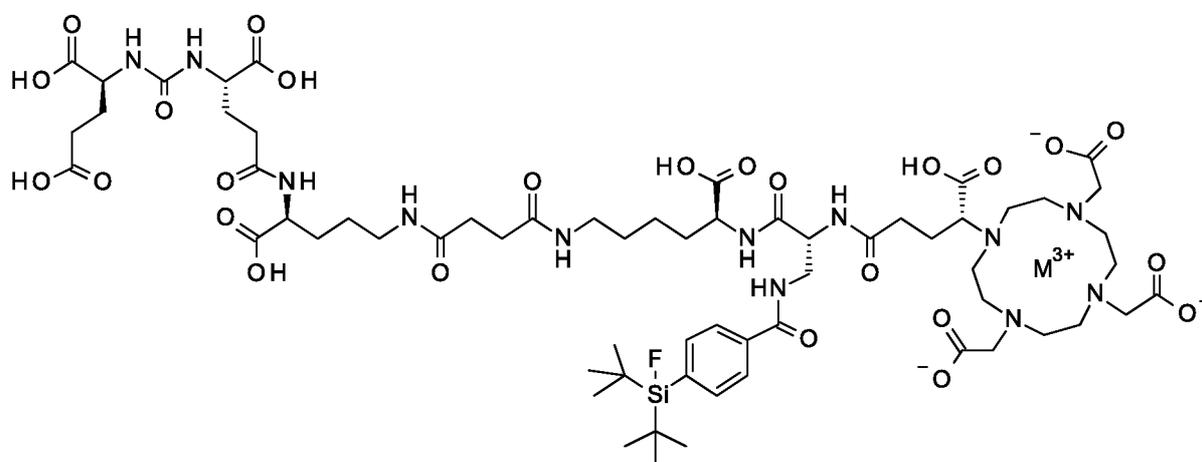
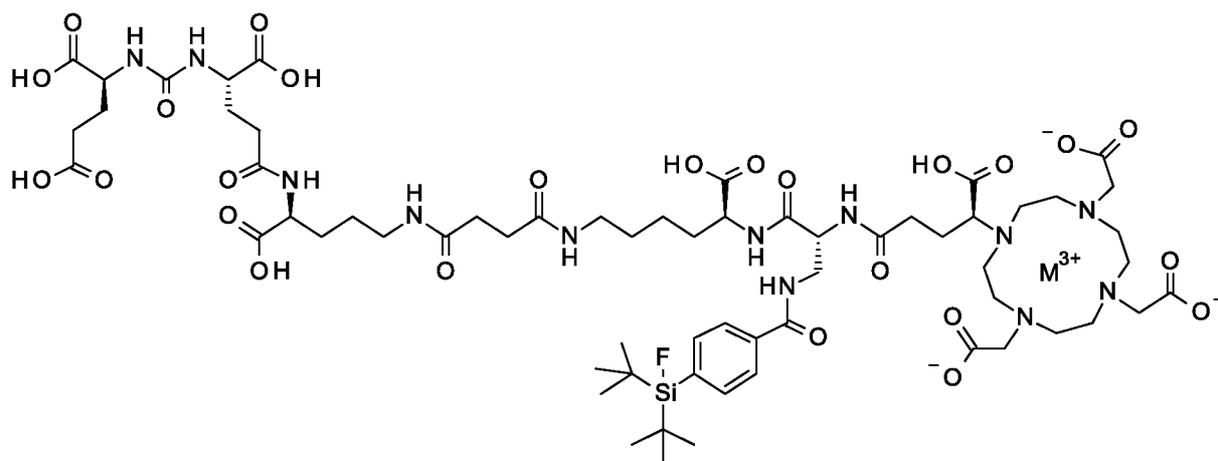
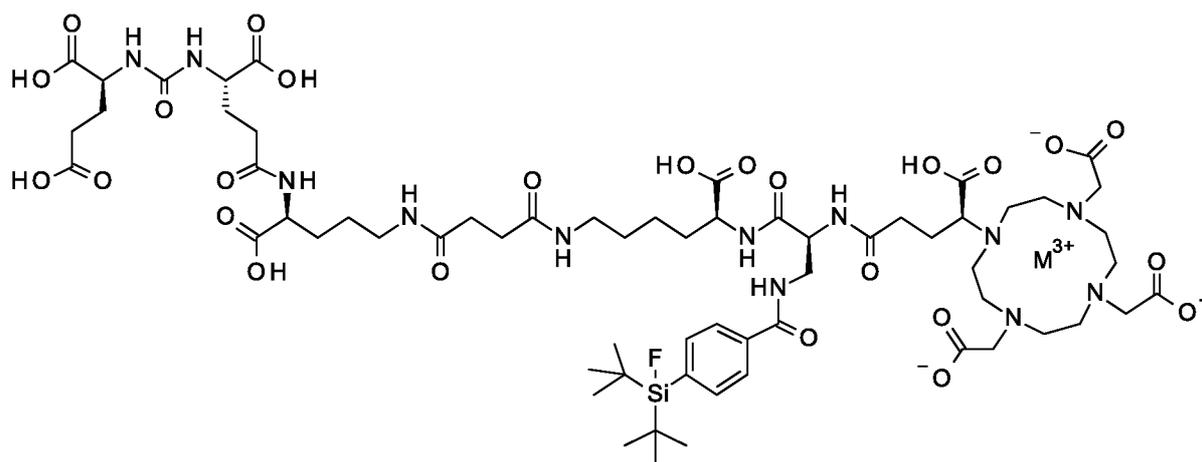


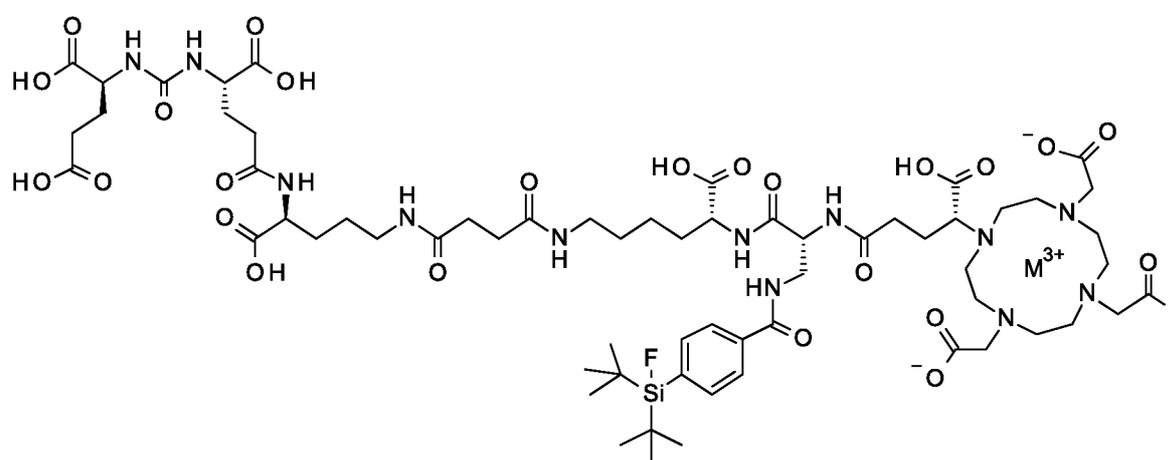
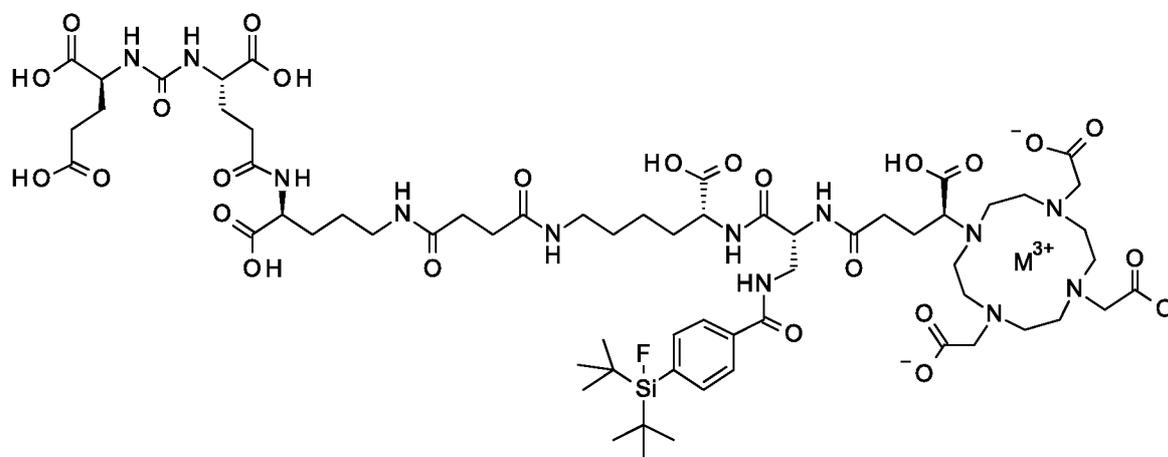
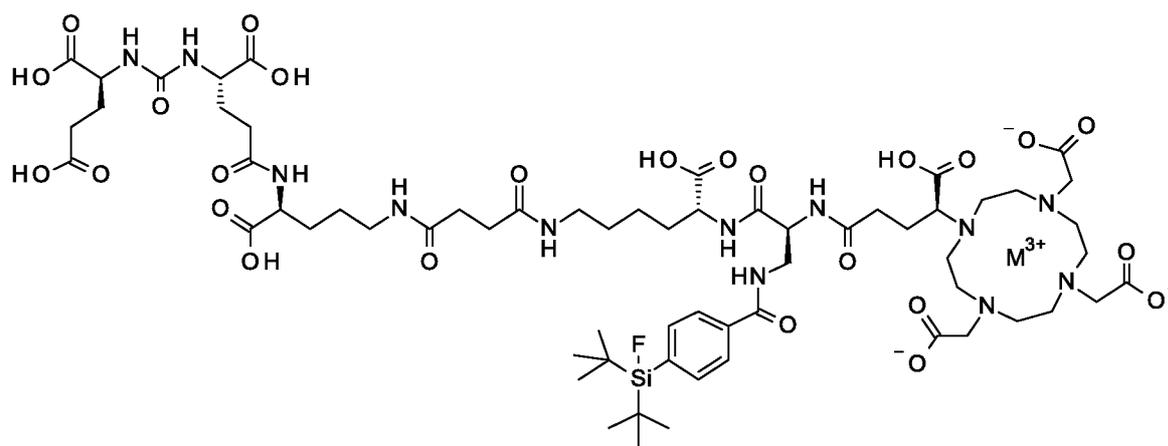
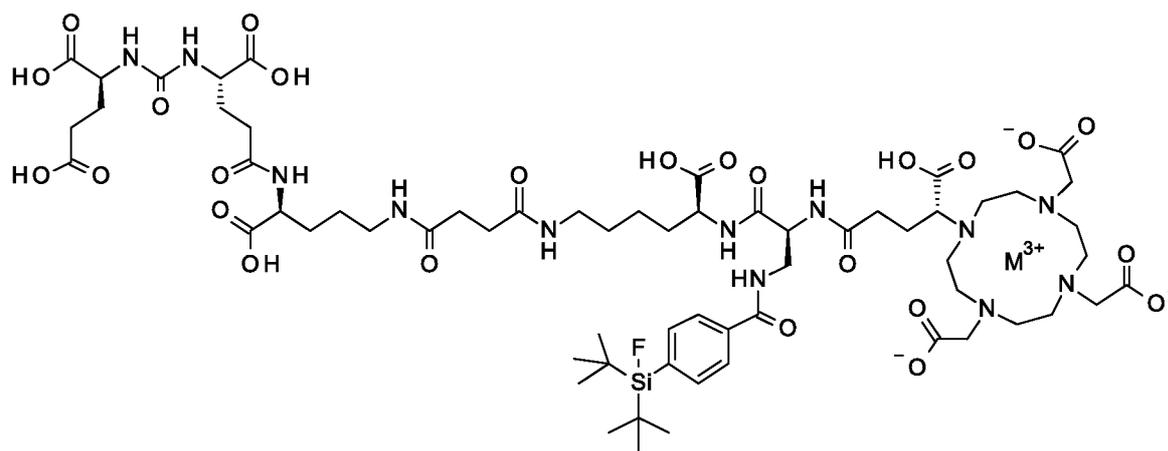


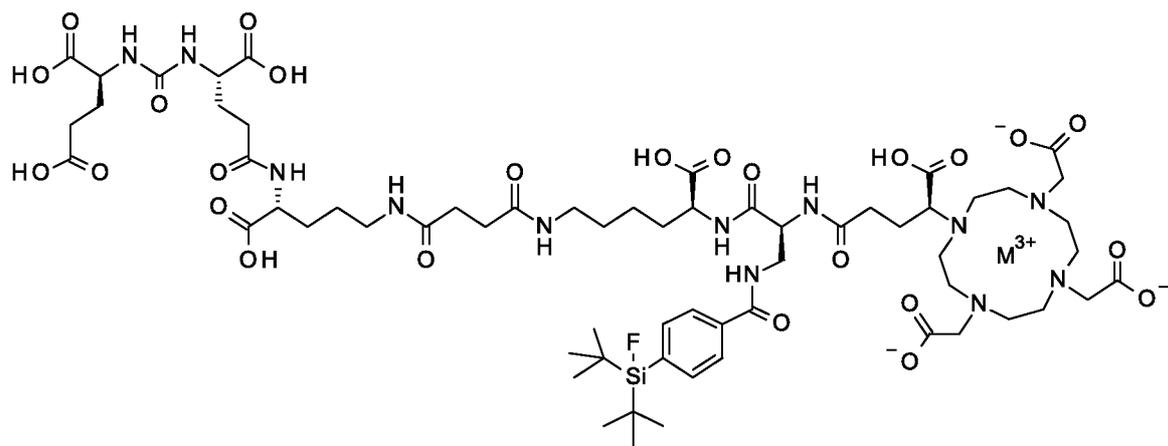
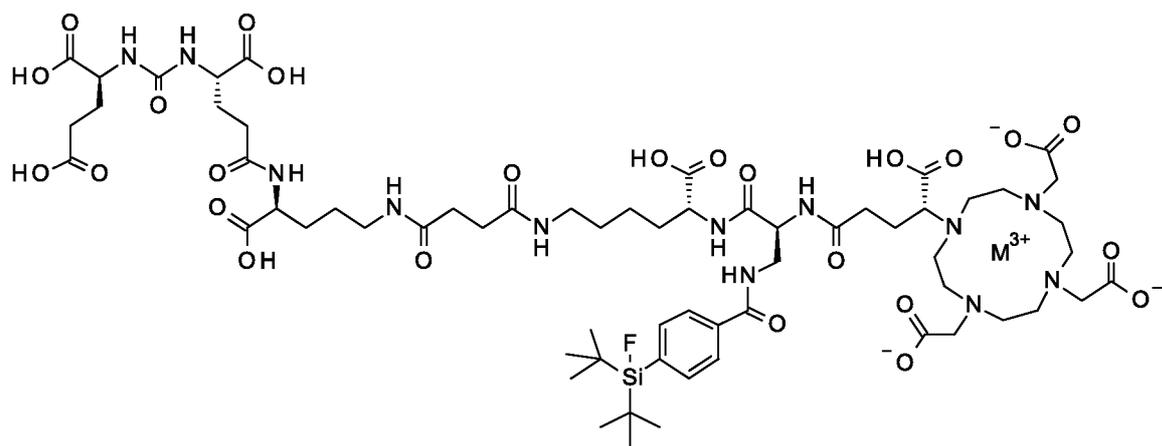
PSMA-SIFA3 (7)

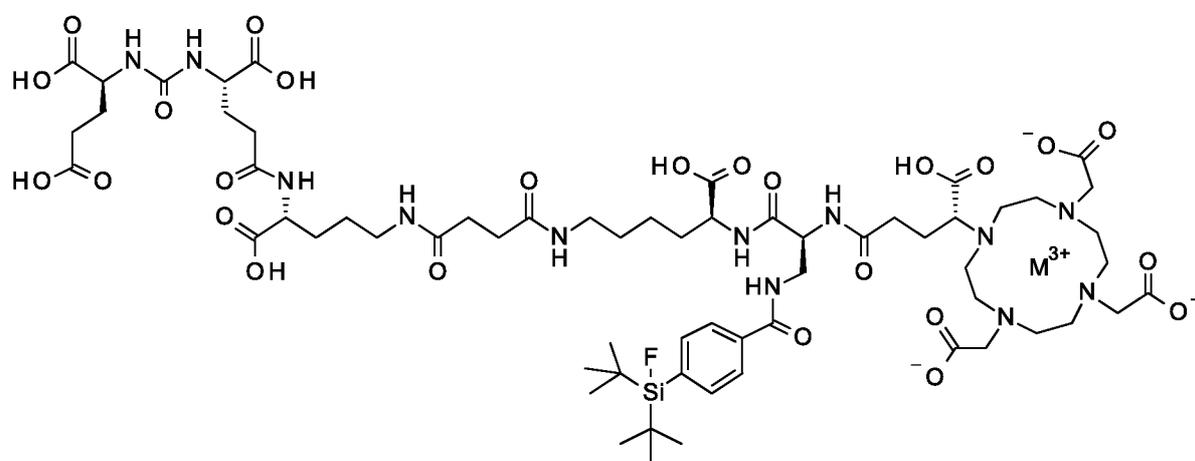
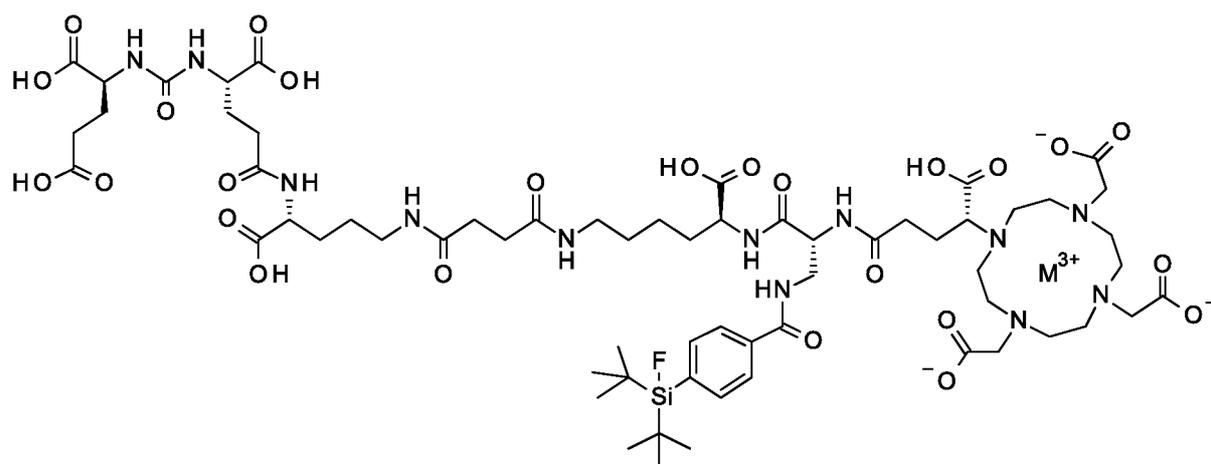
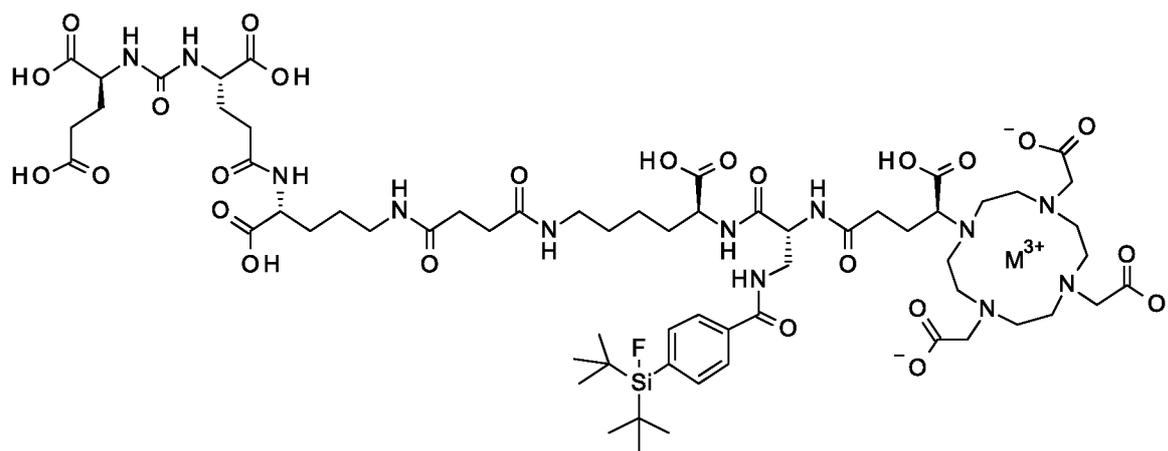


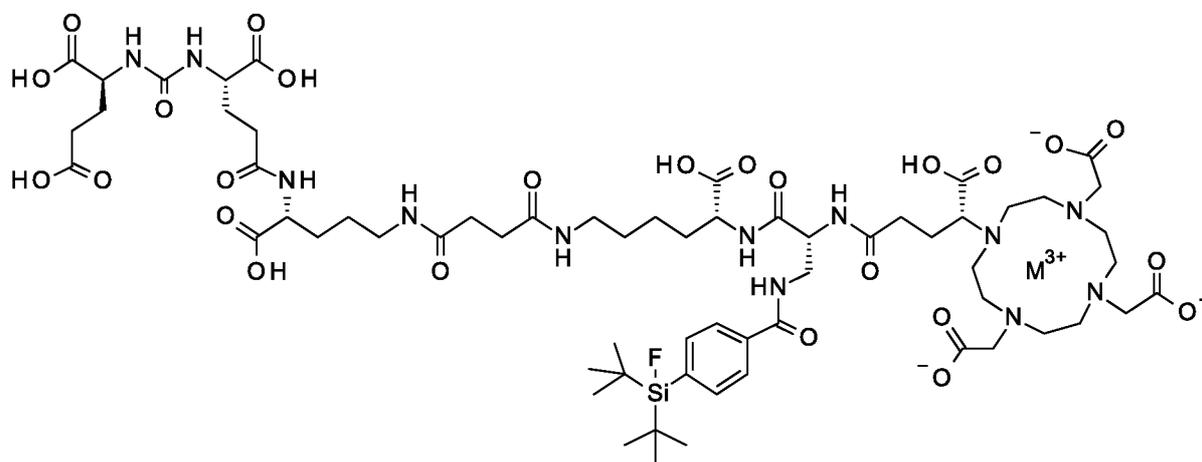
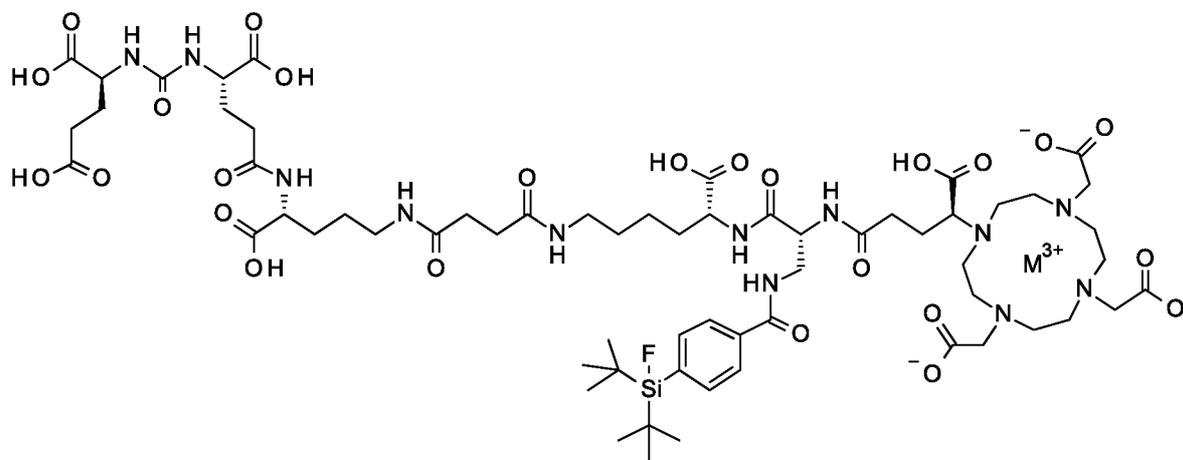
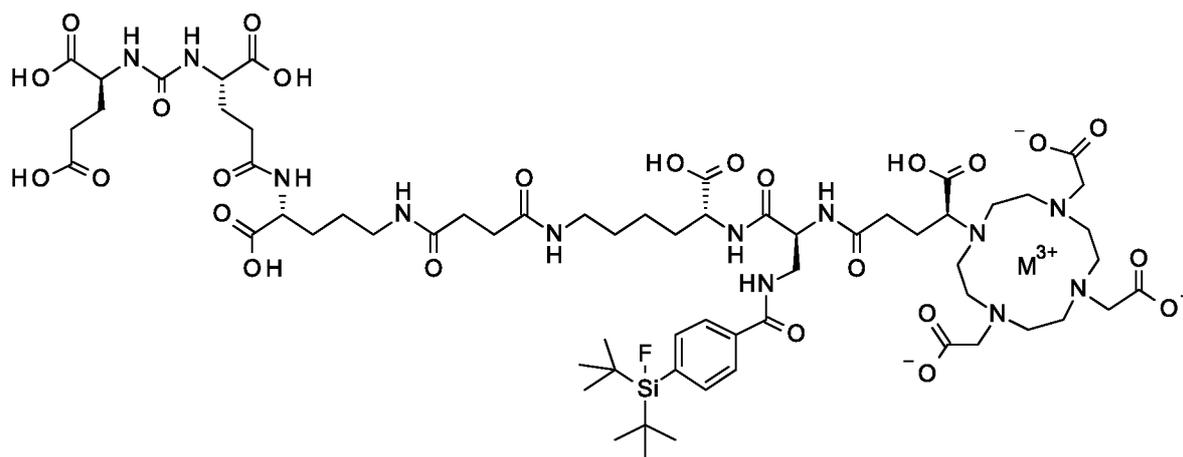
и их изомеры

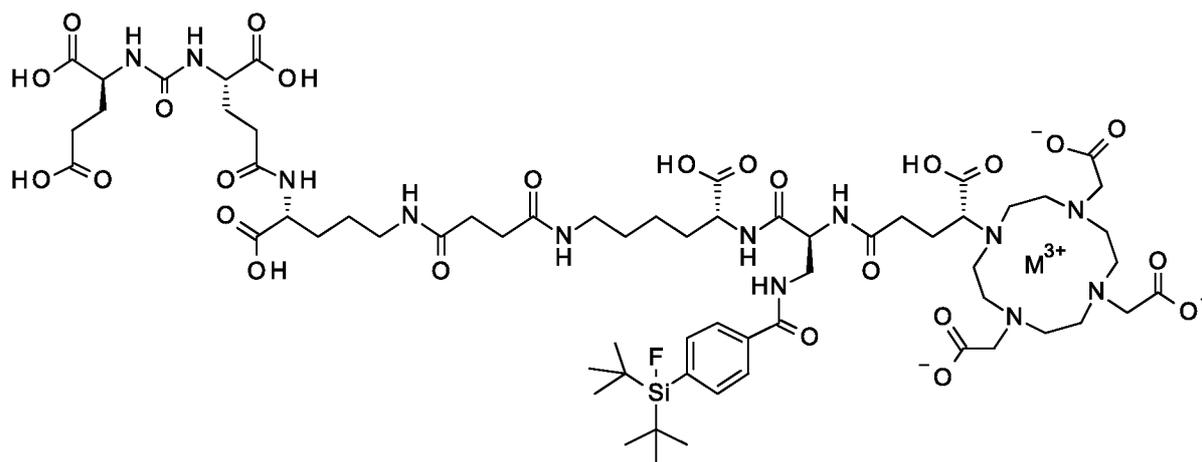




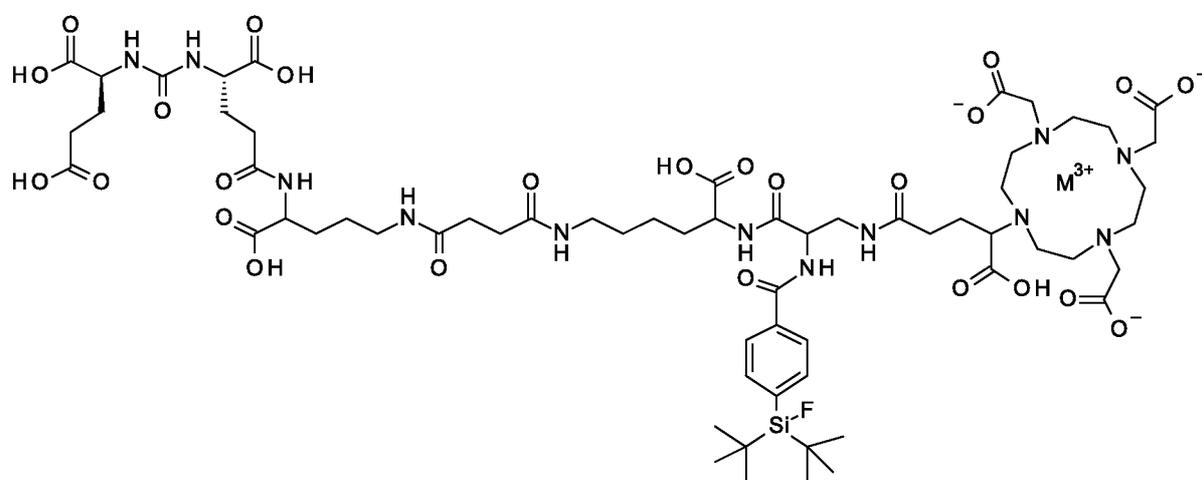




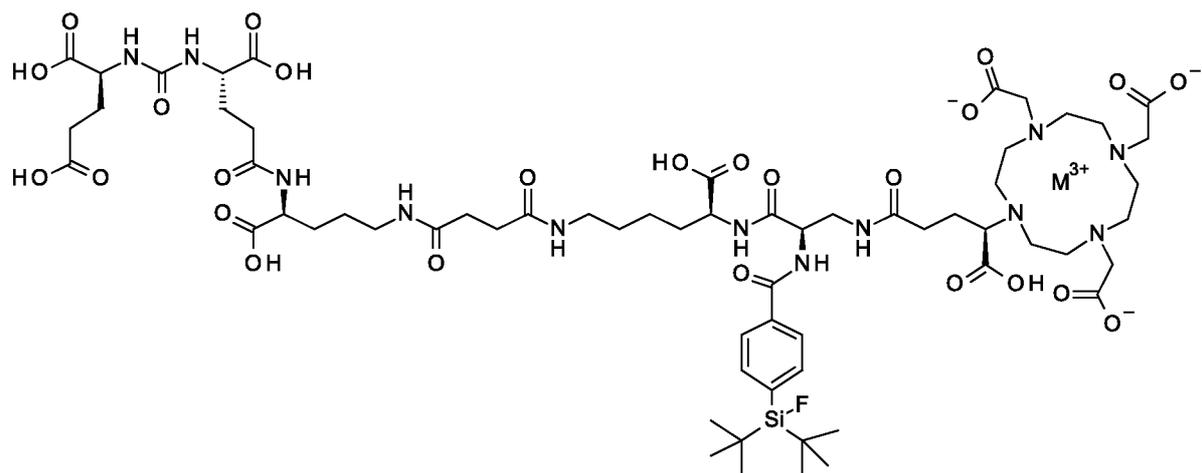


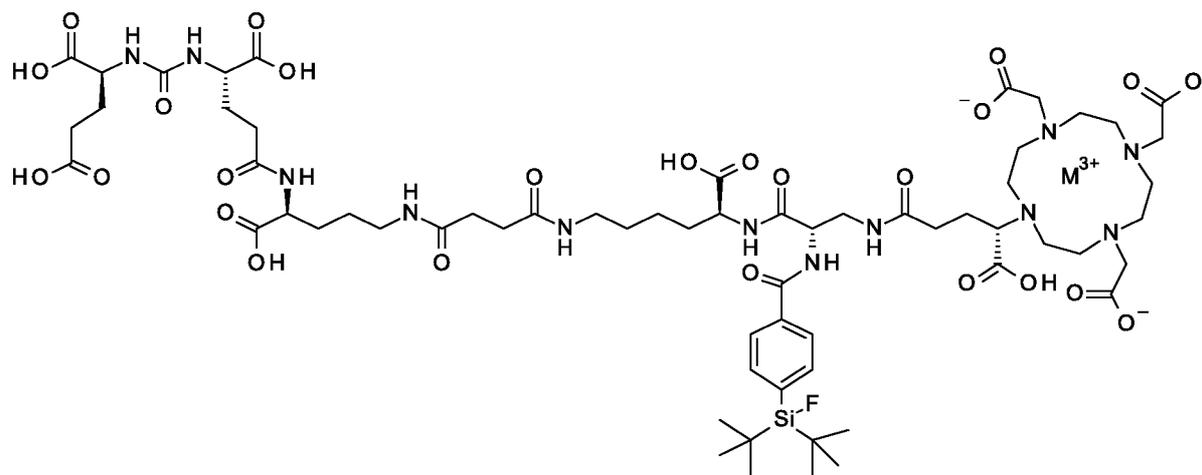
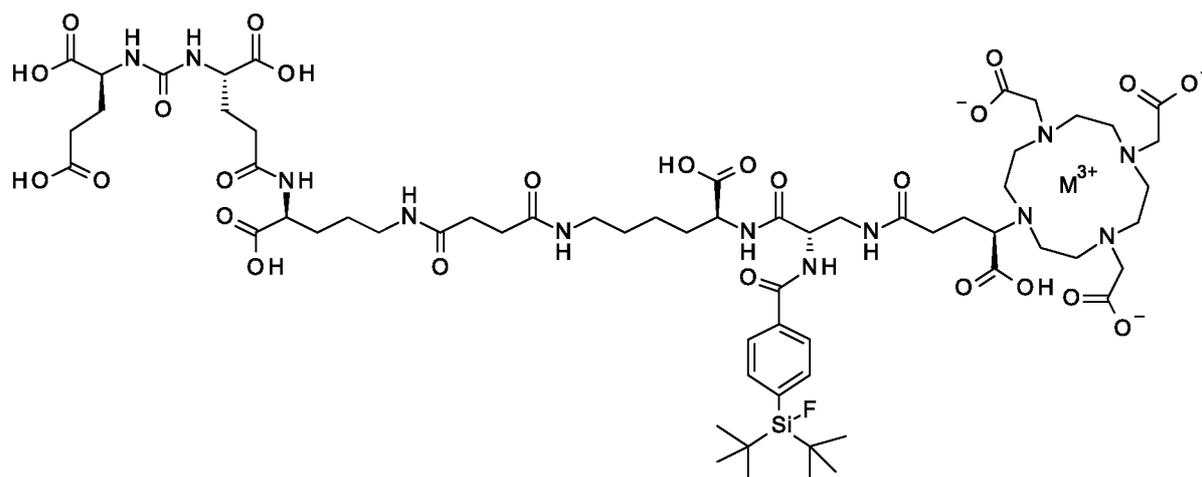


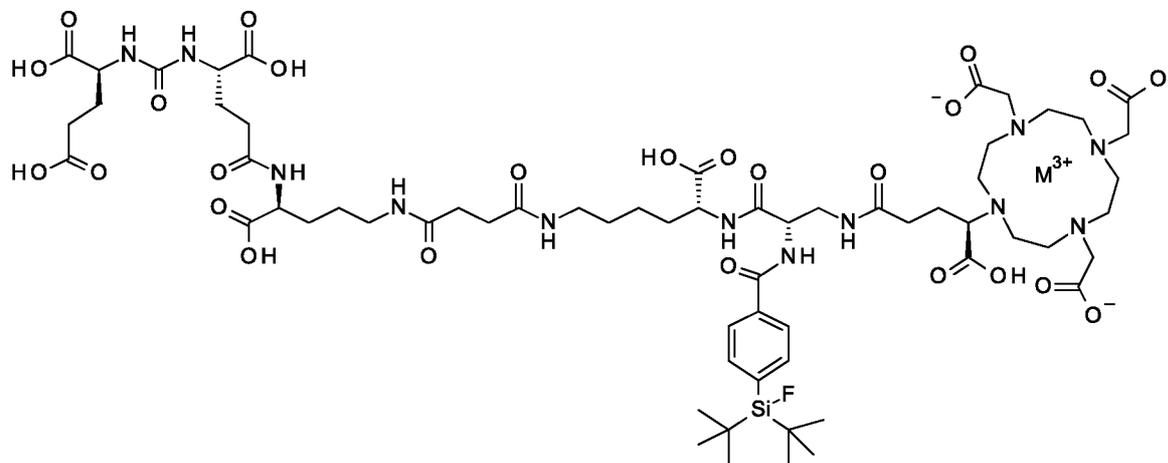
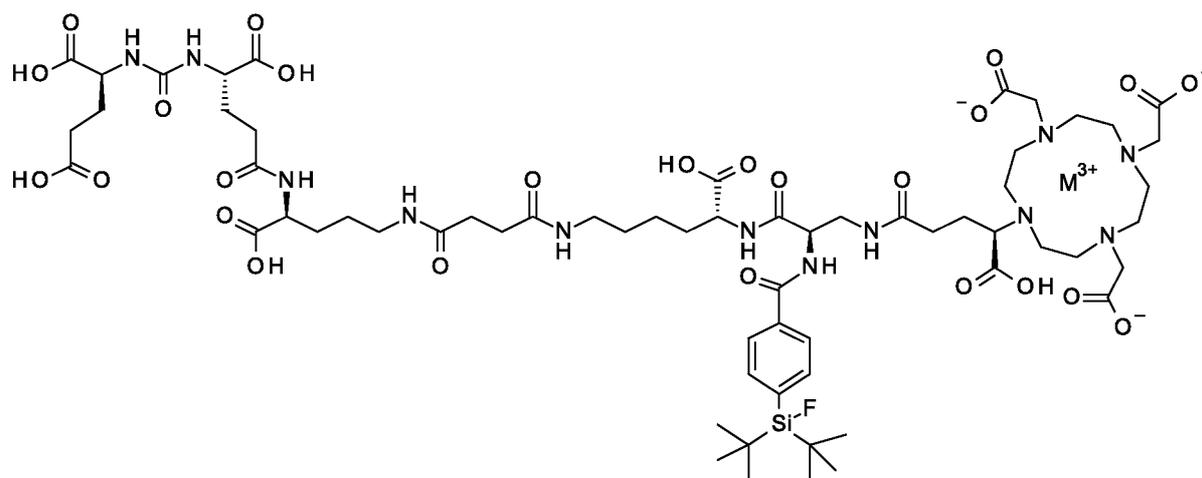
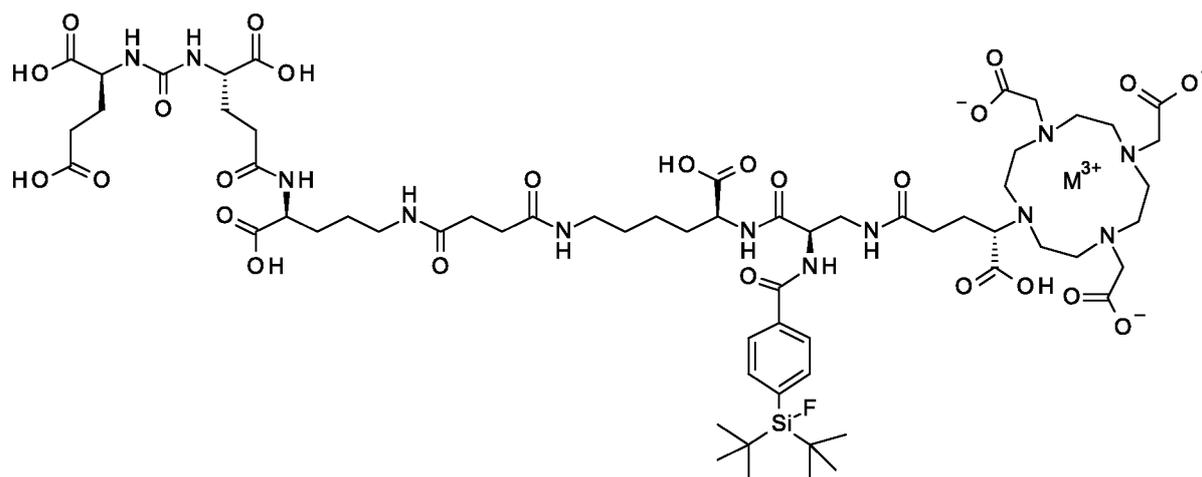
PSMA-SIFA4 (8)

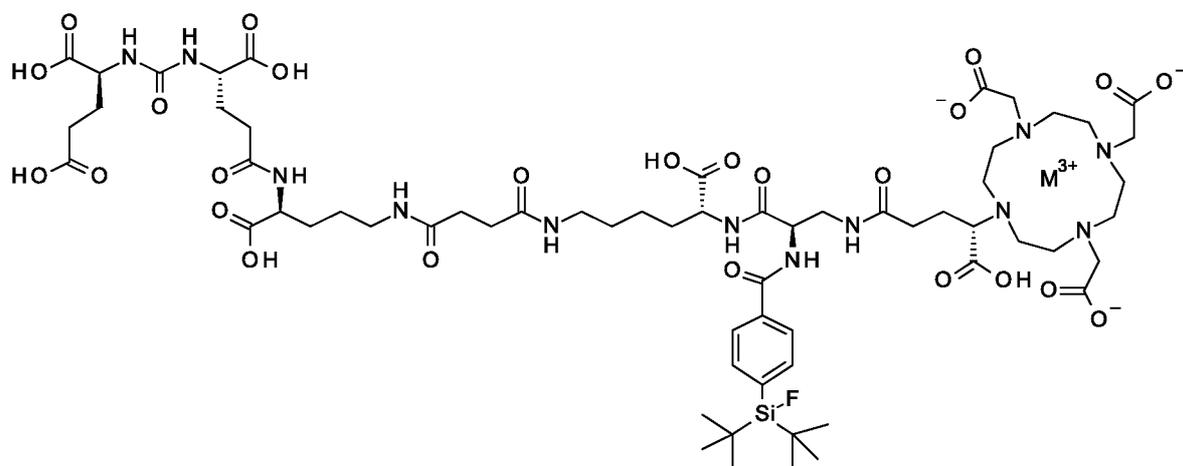
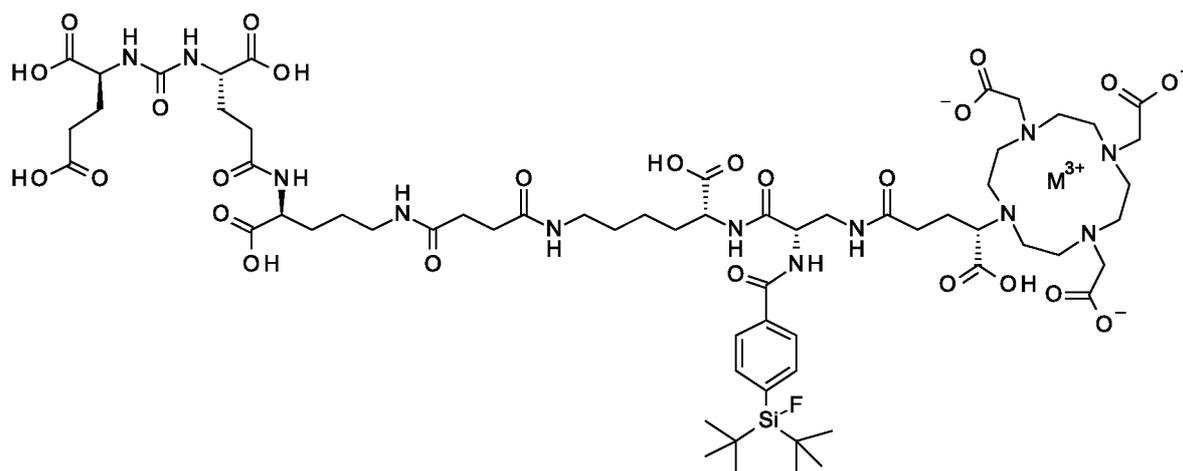


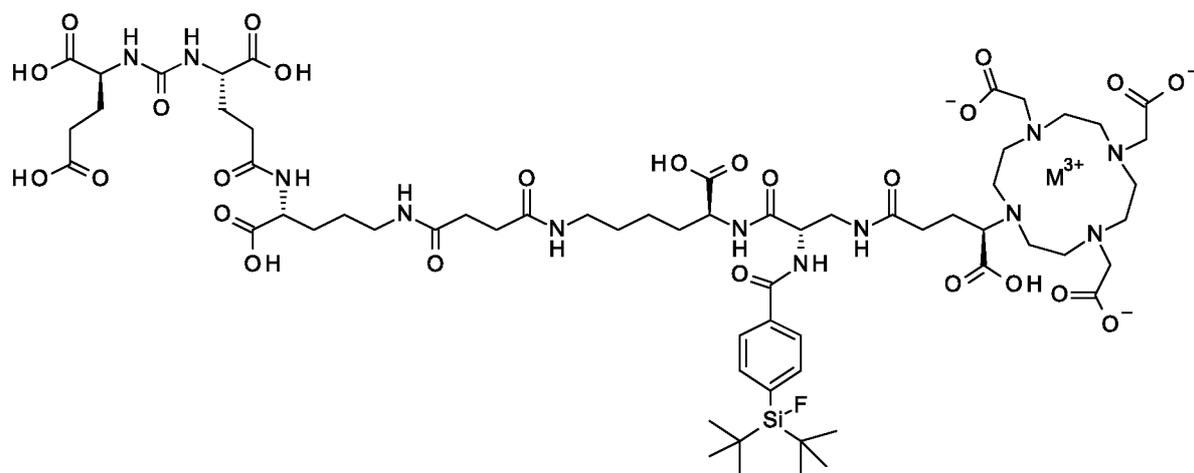
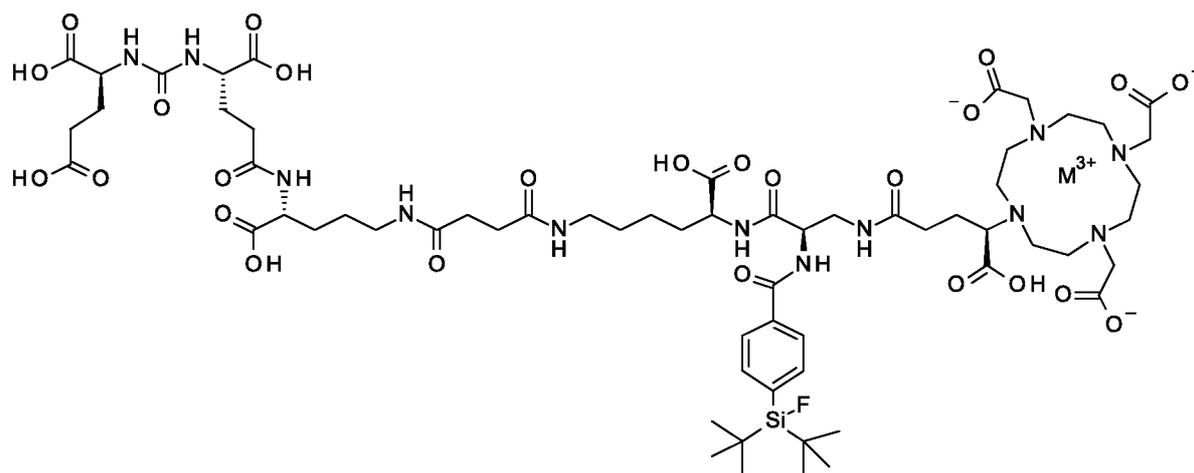
и их изомеры

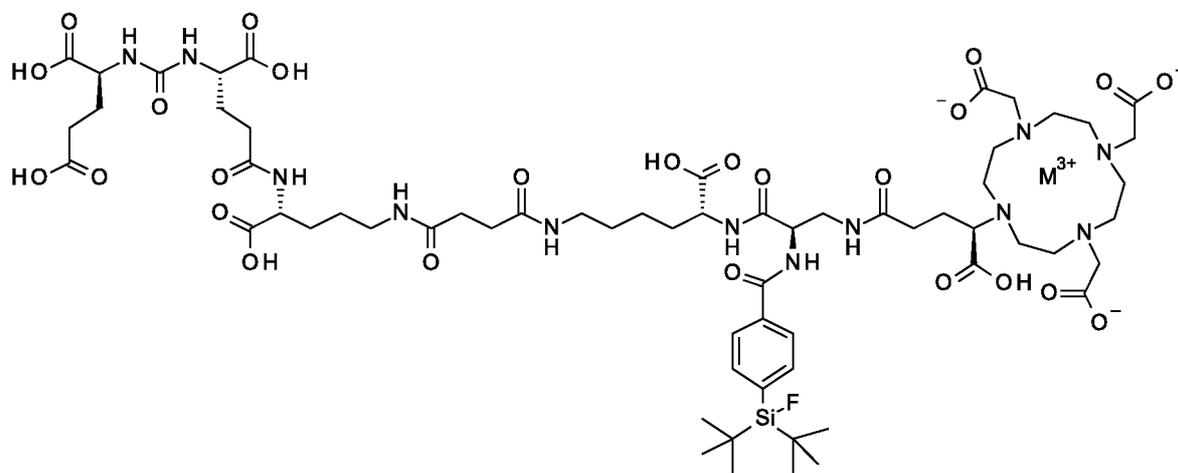
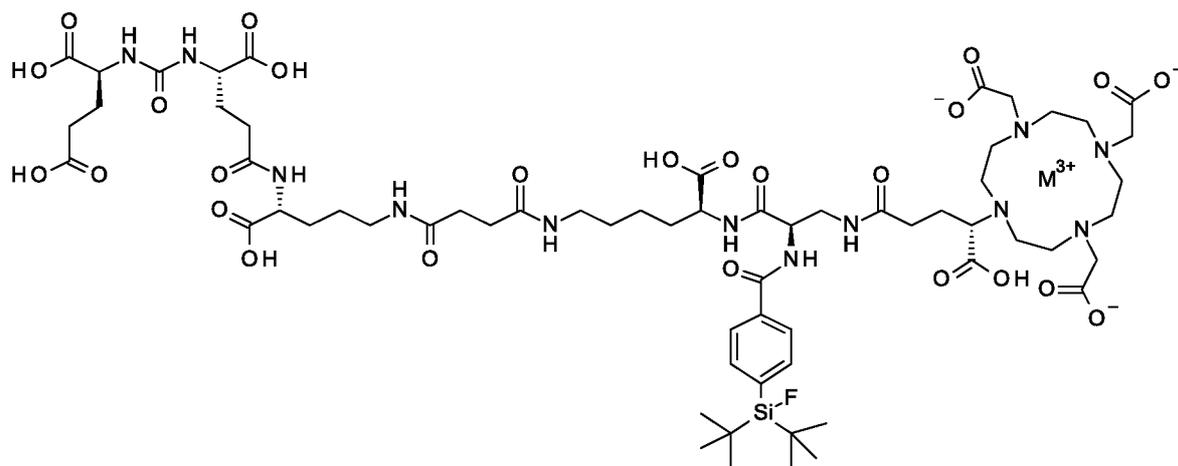
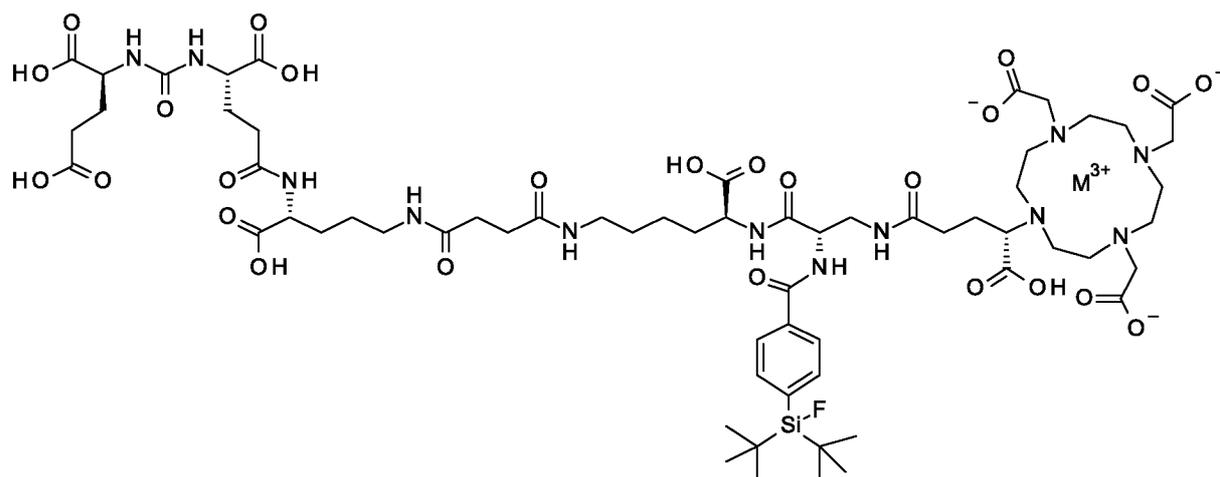


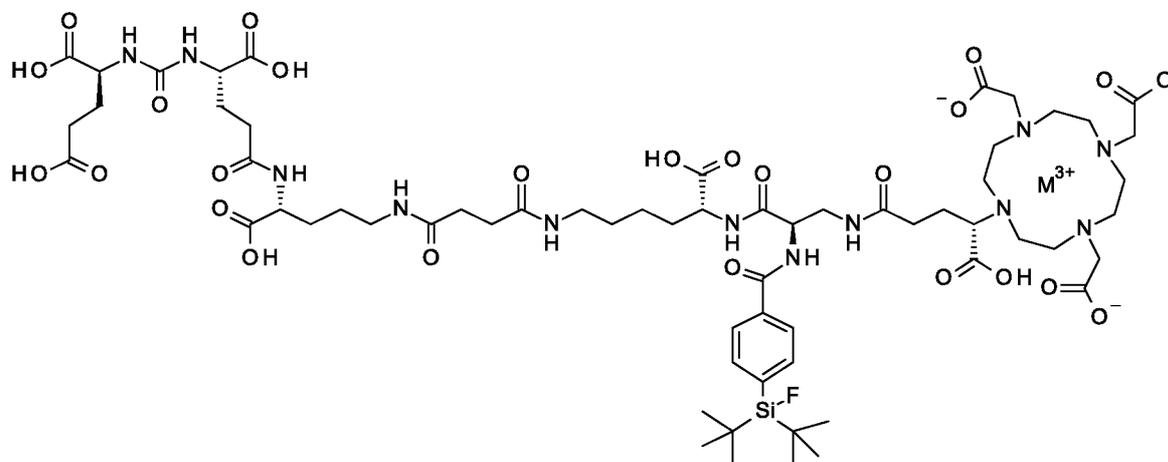
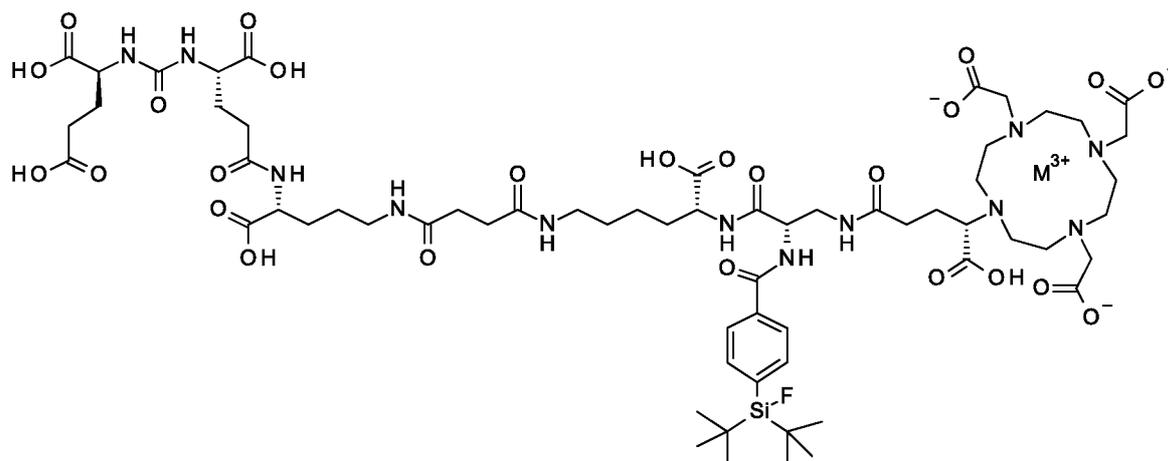
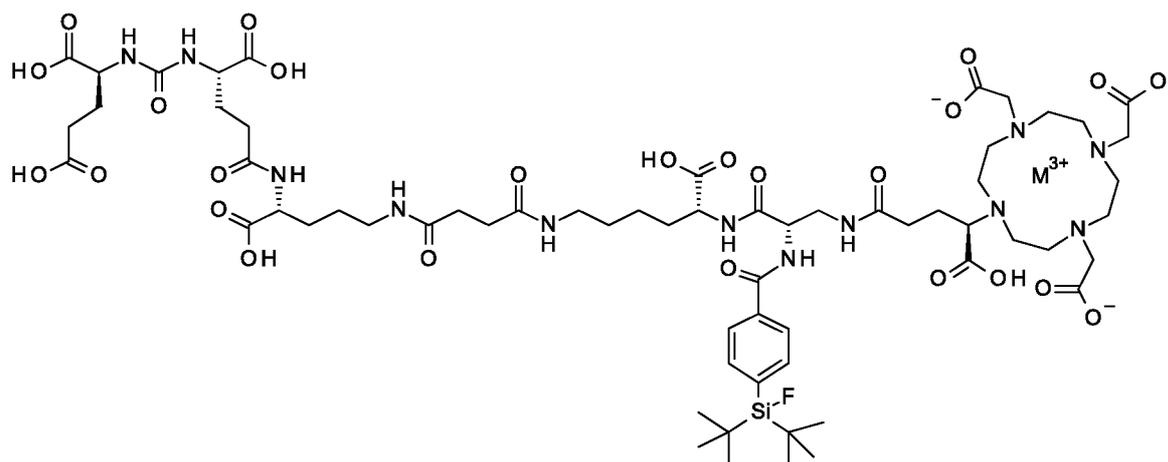




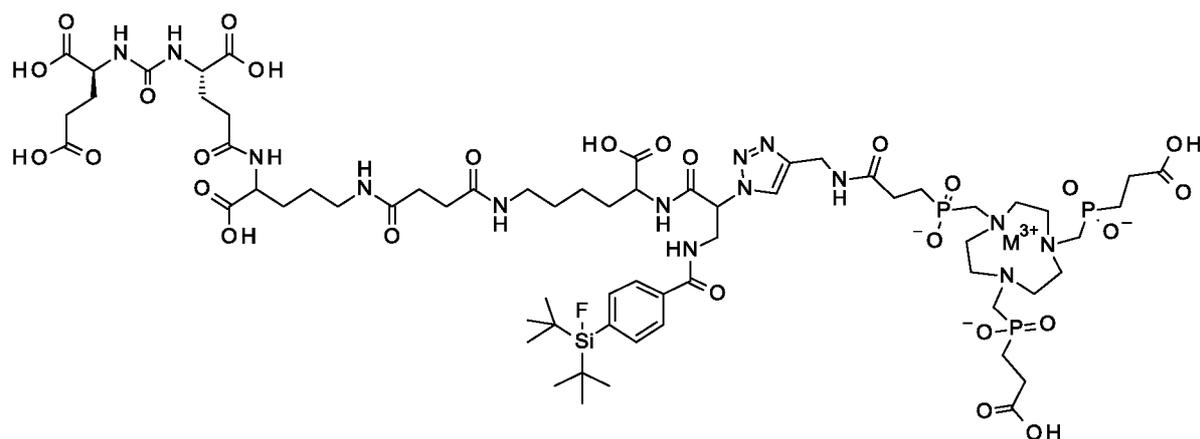




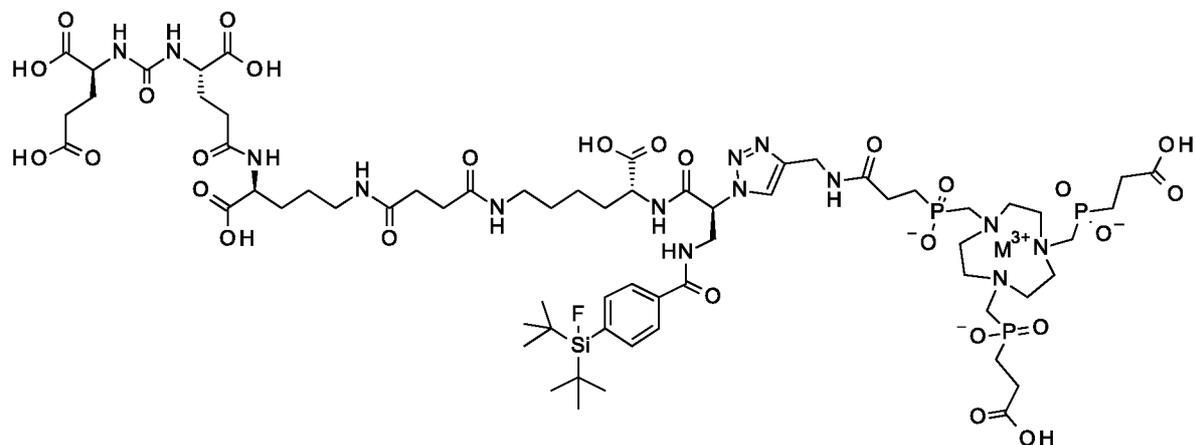
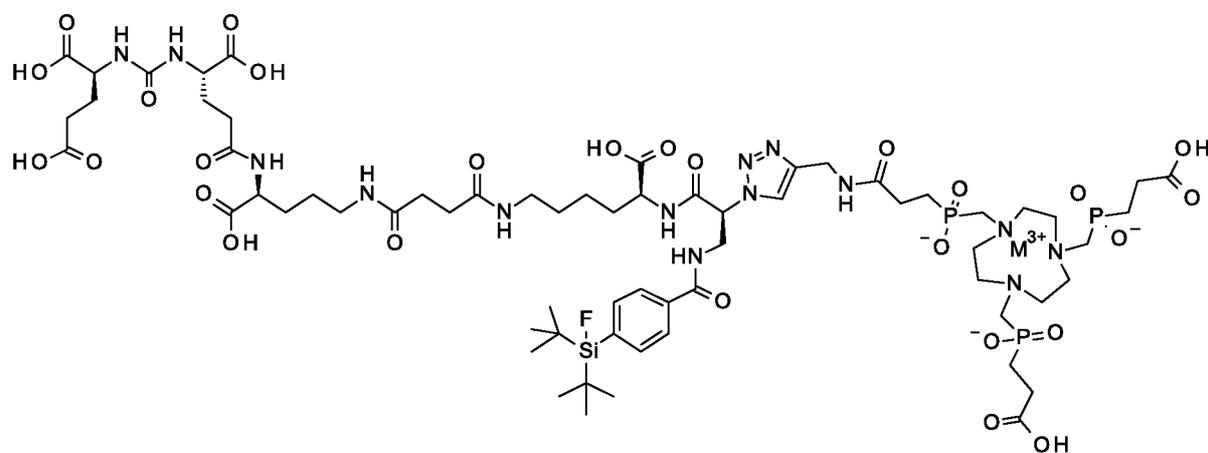


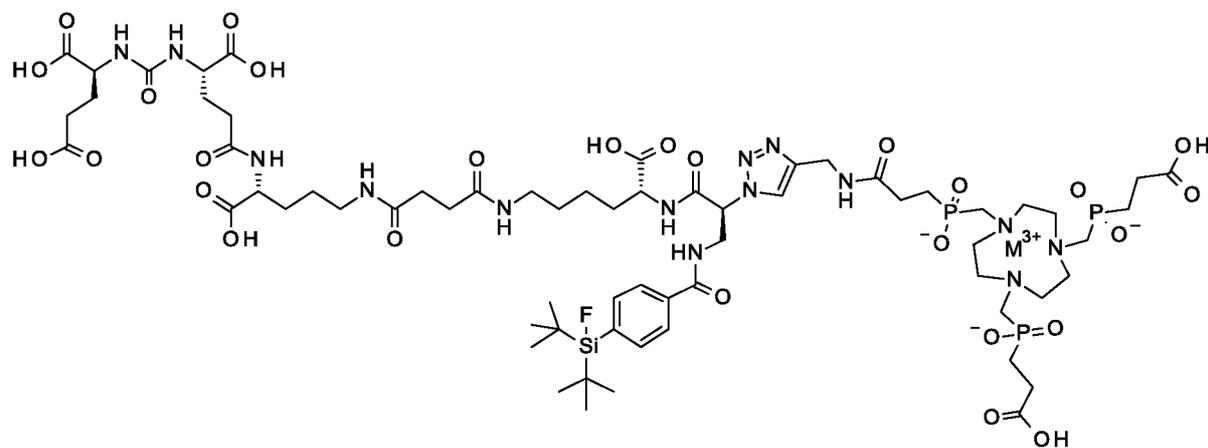
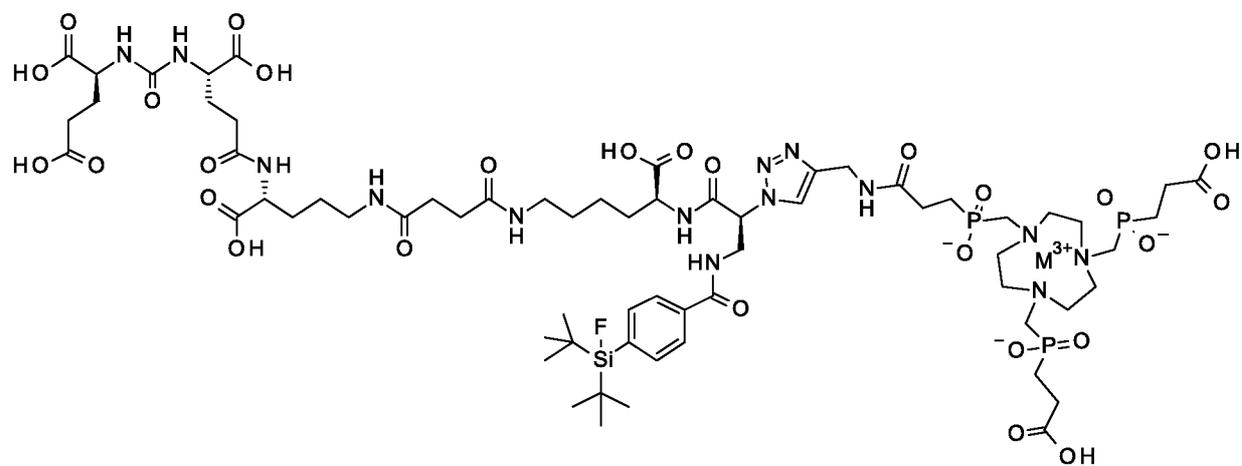
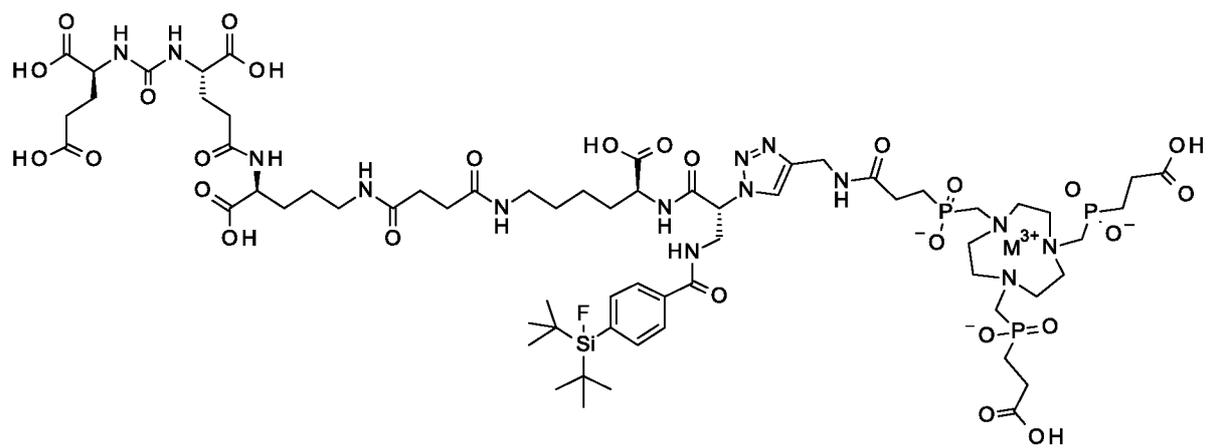
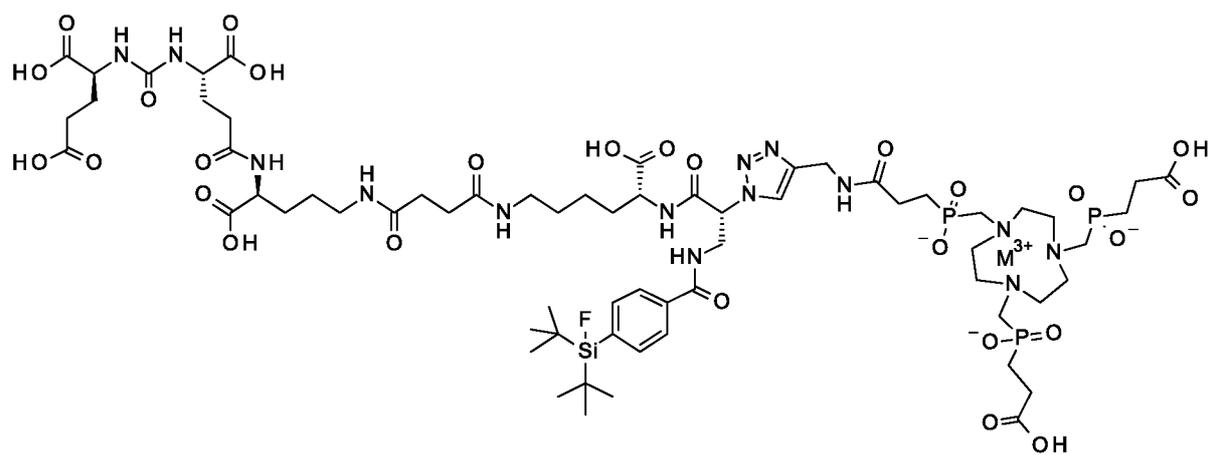


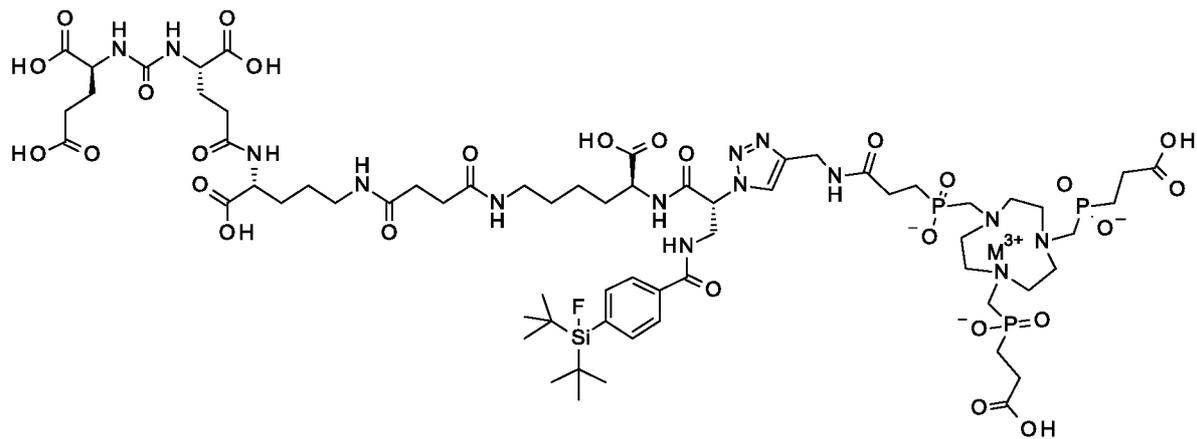
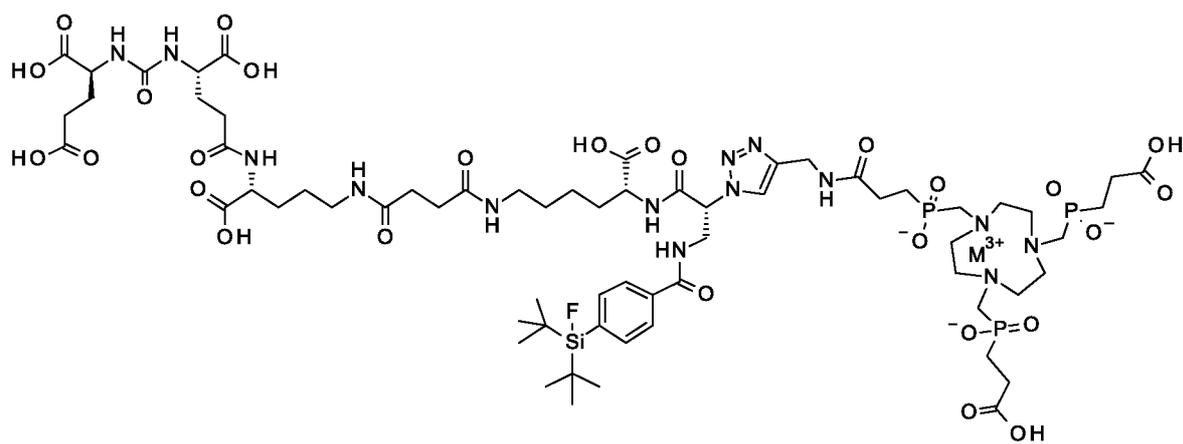
PSMA-SIFA5 (9)



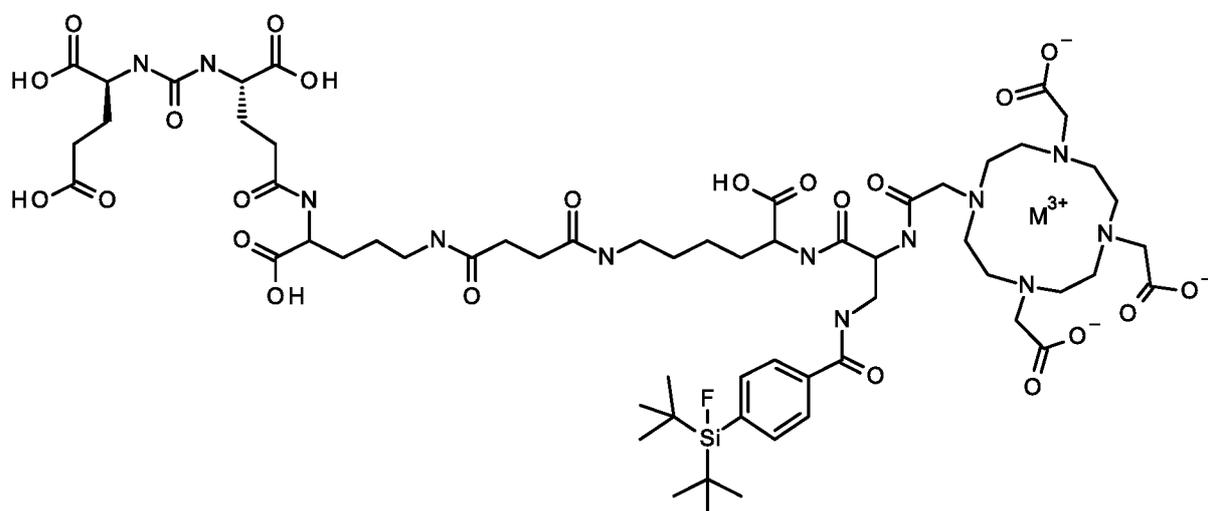
и их изомеры:



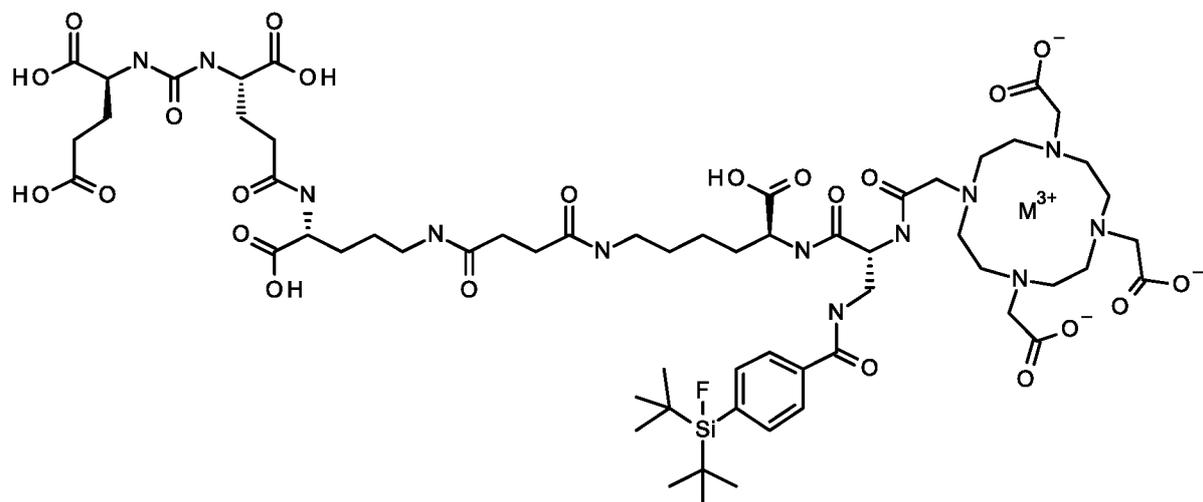
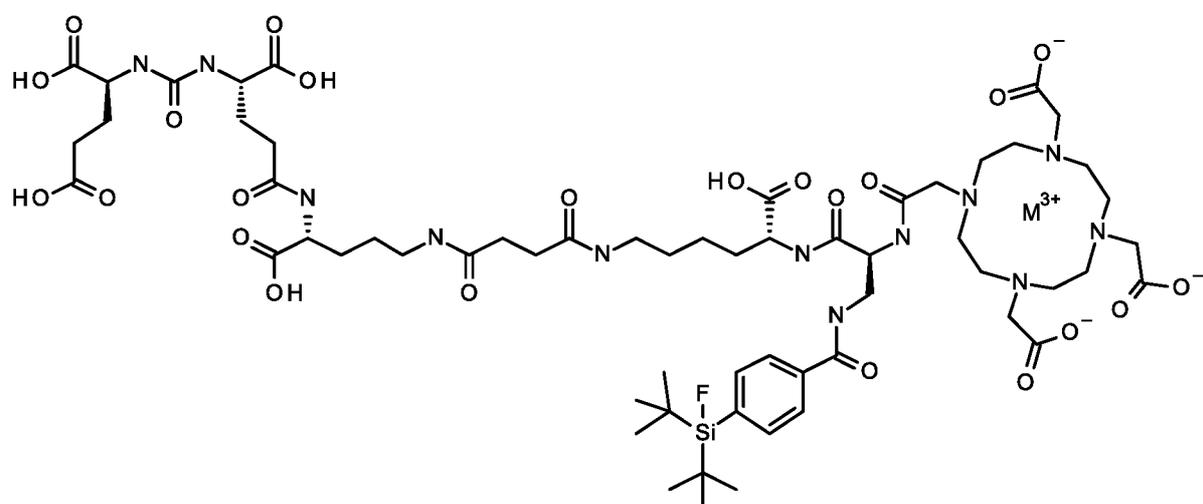
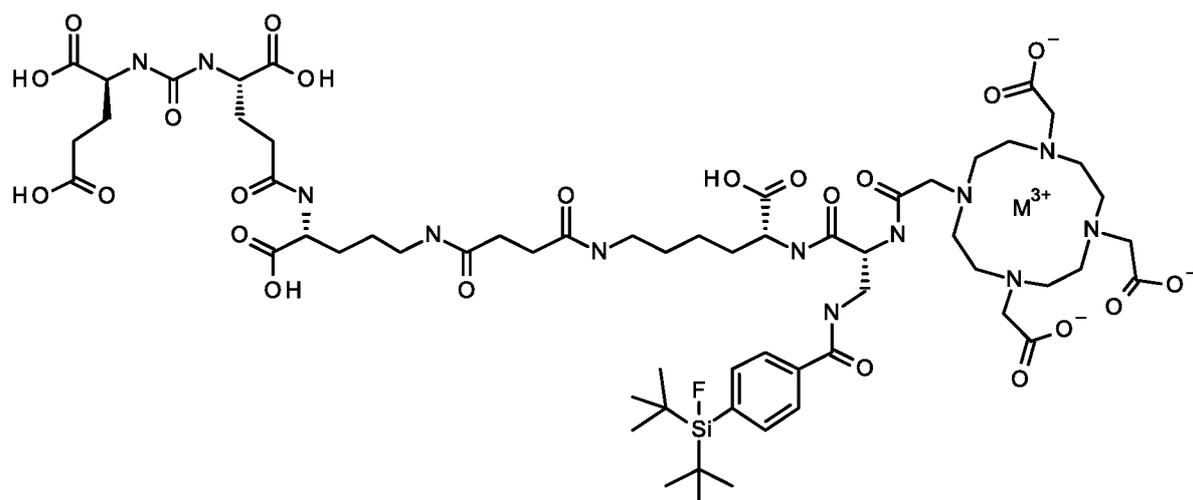


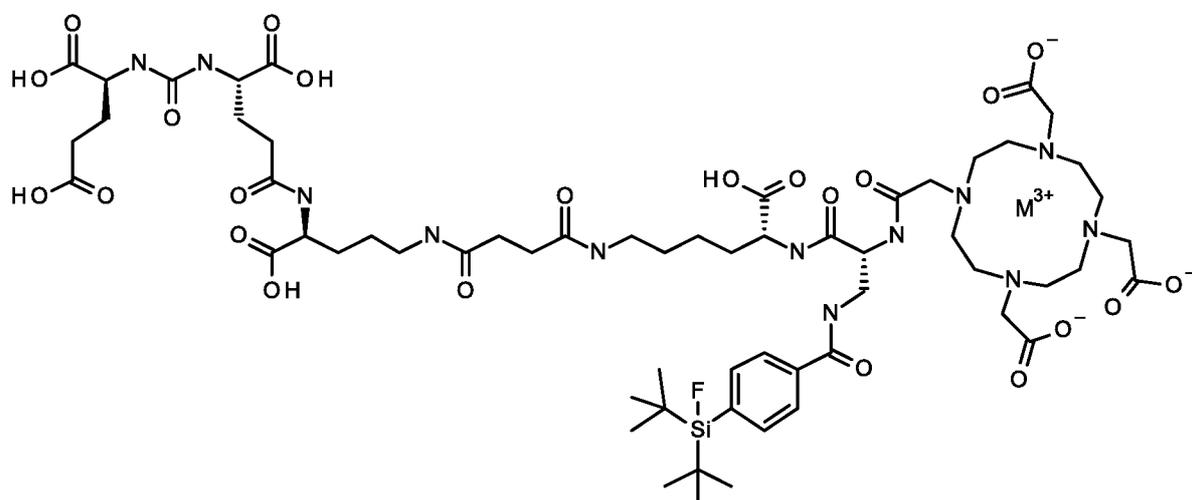
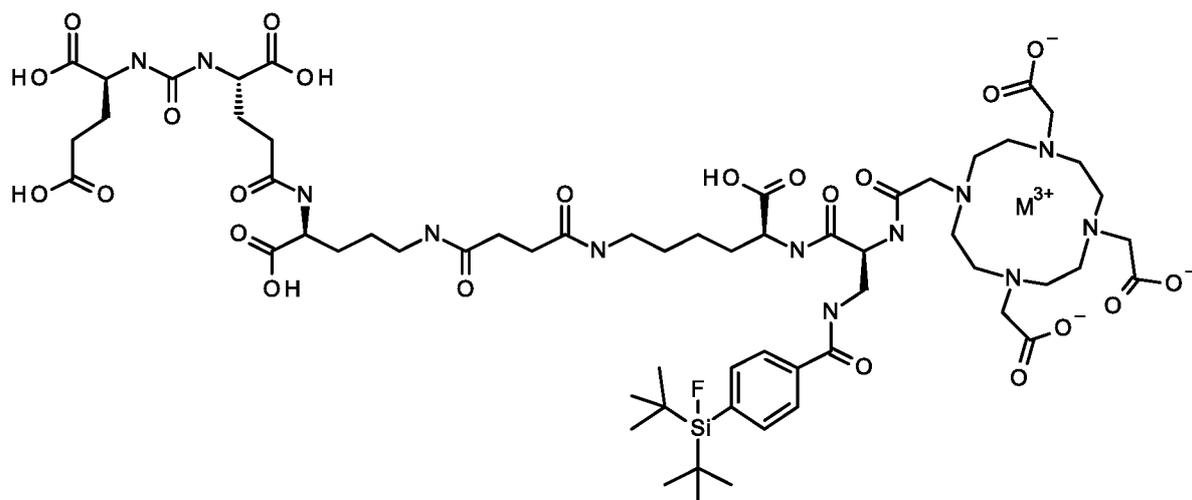
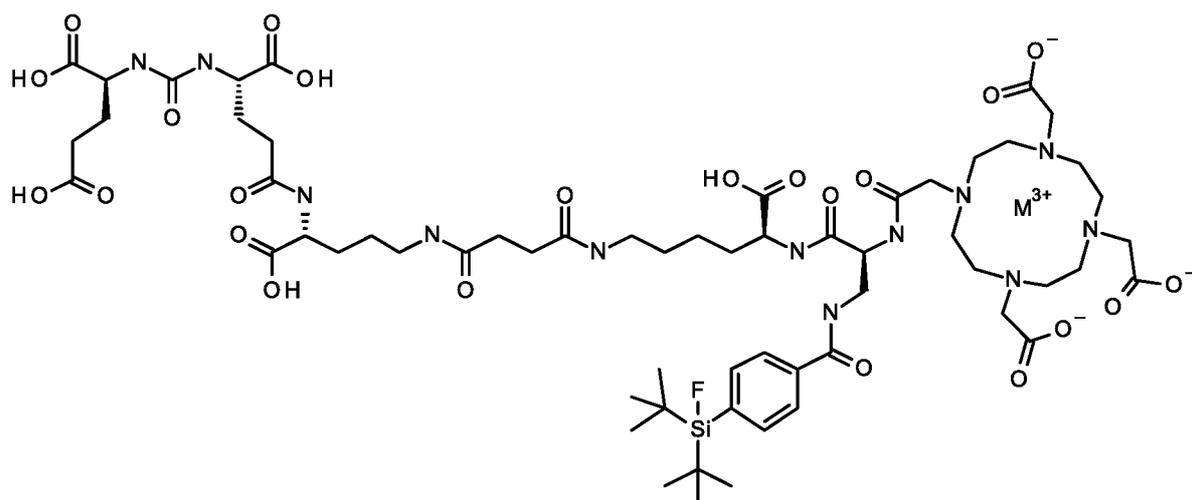


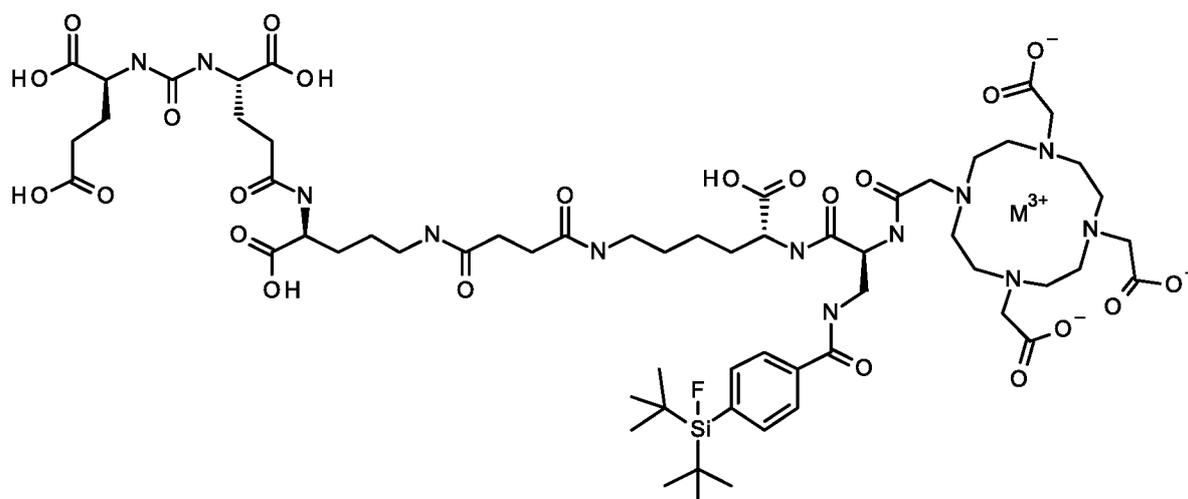
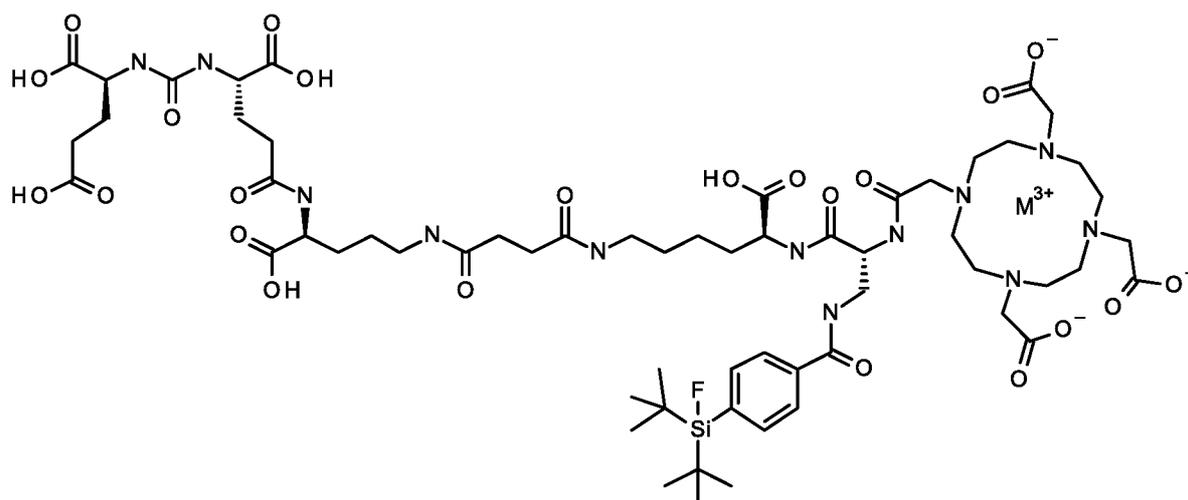
PSMA-SIFA 10



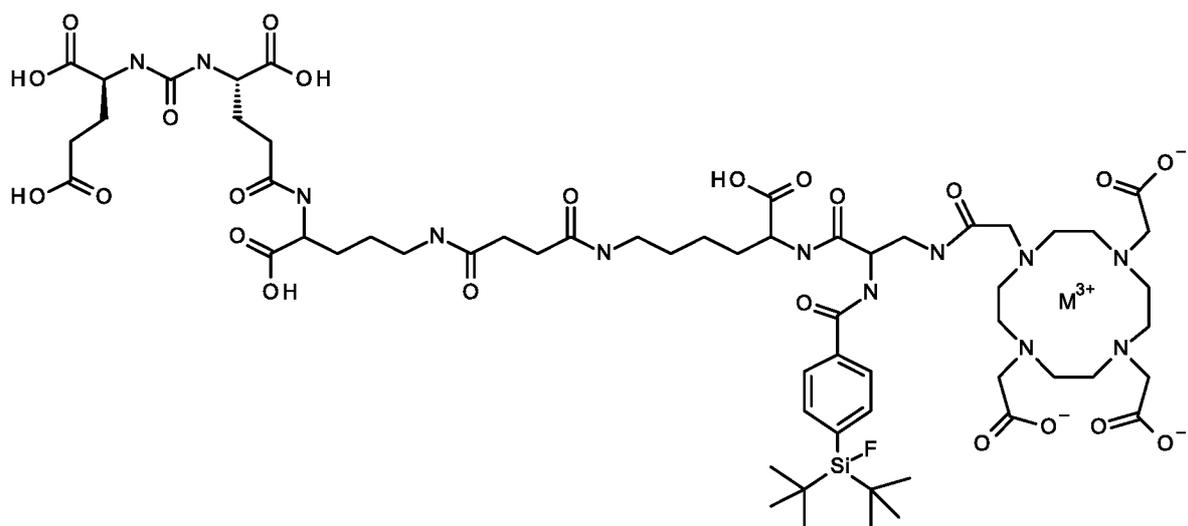
и их изомеры:



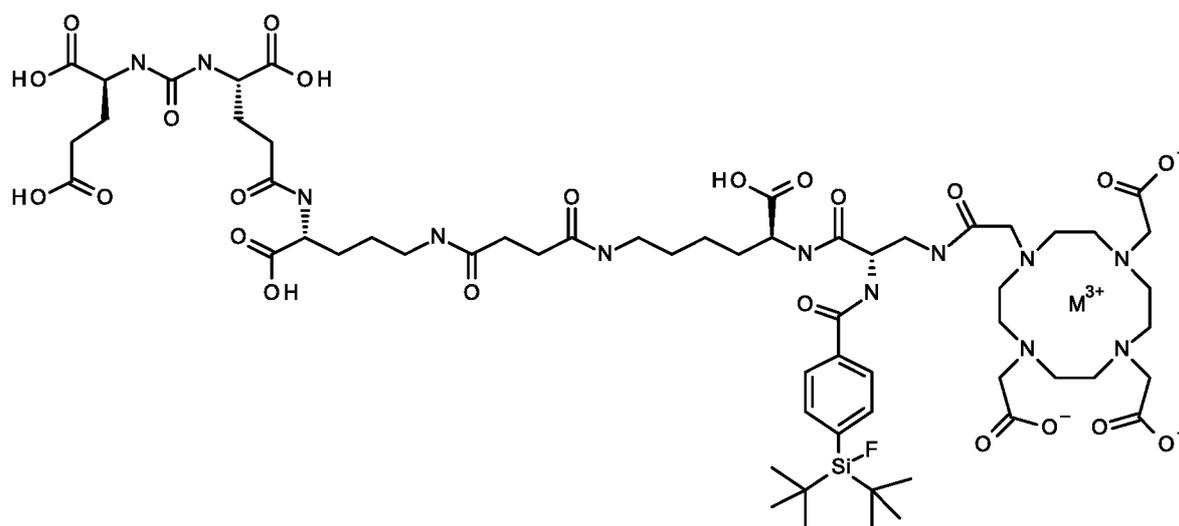
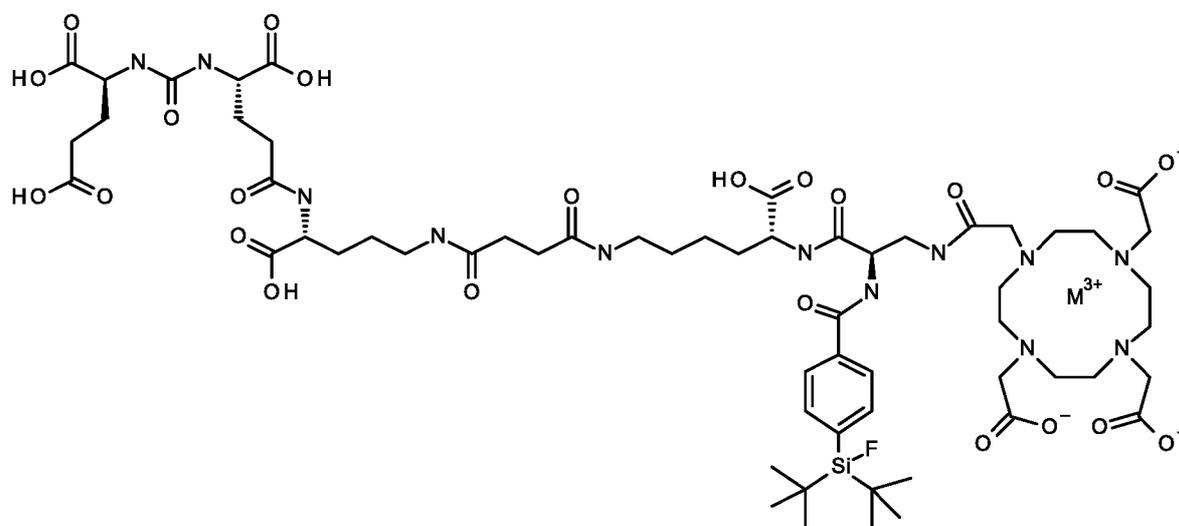
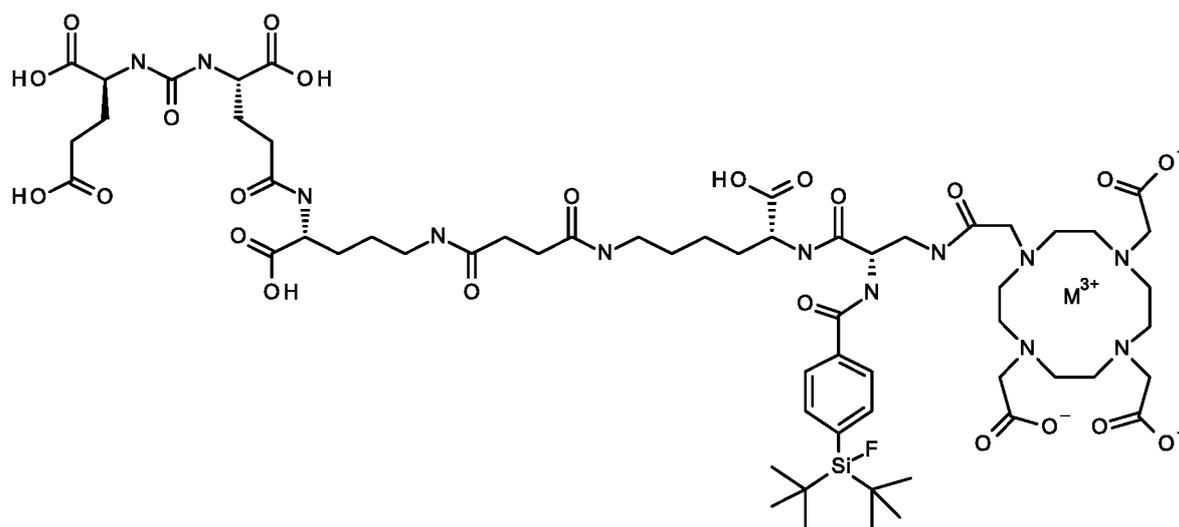


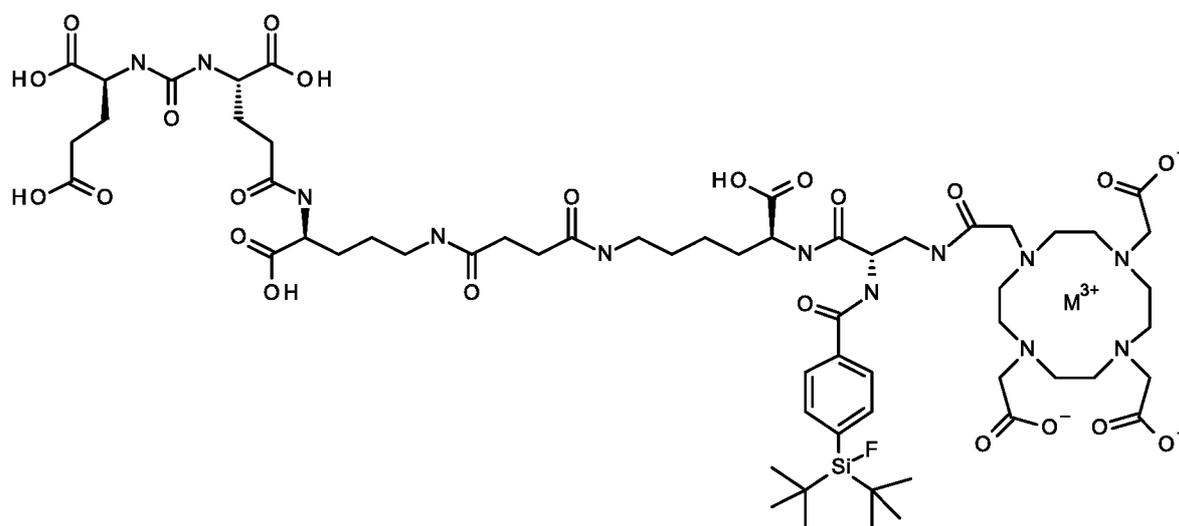
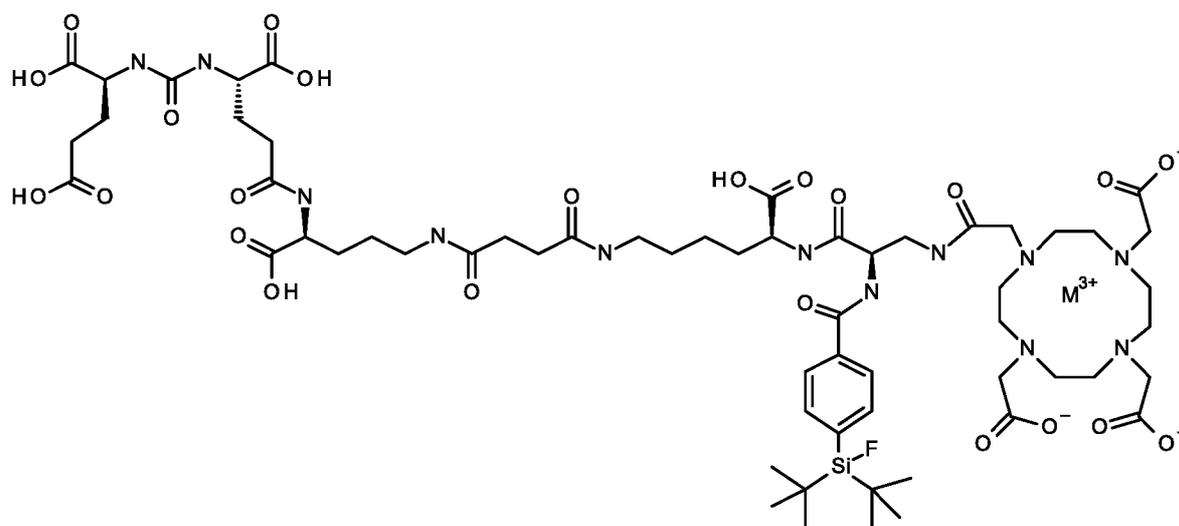
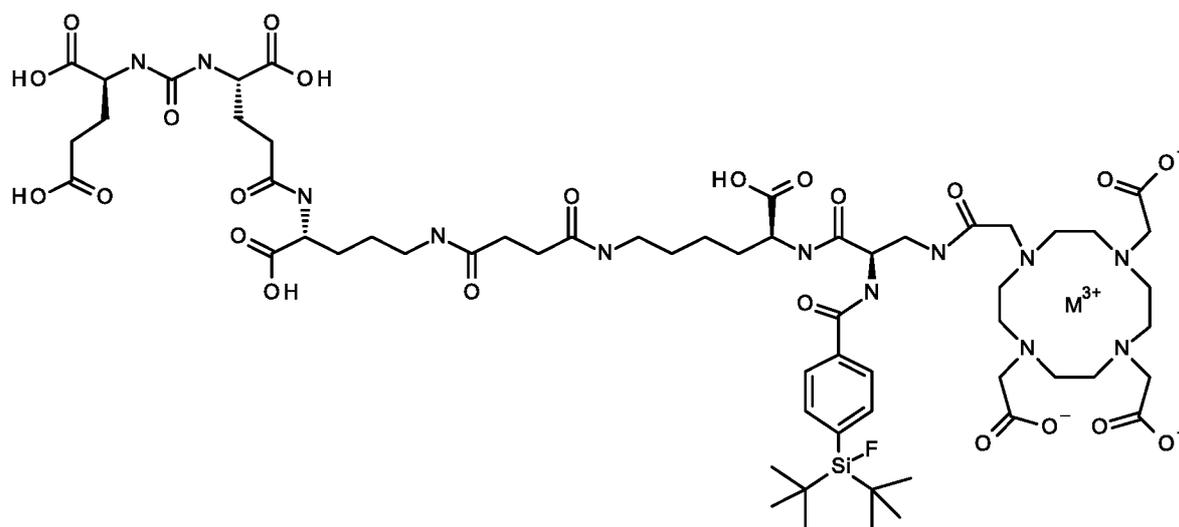


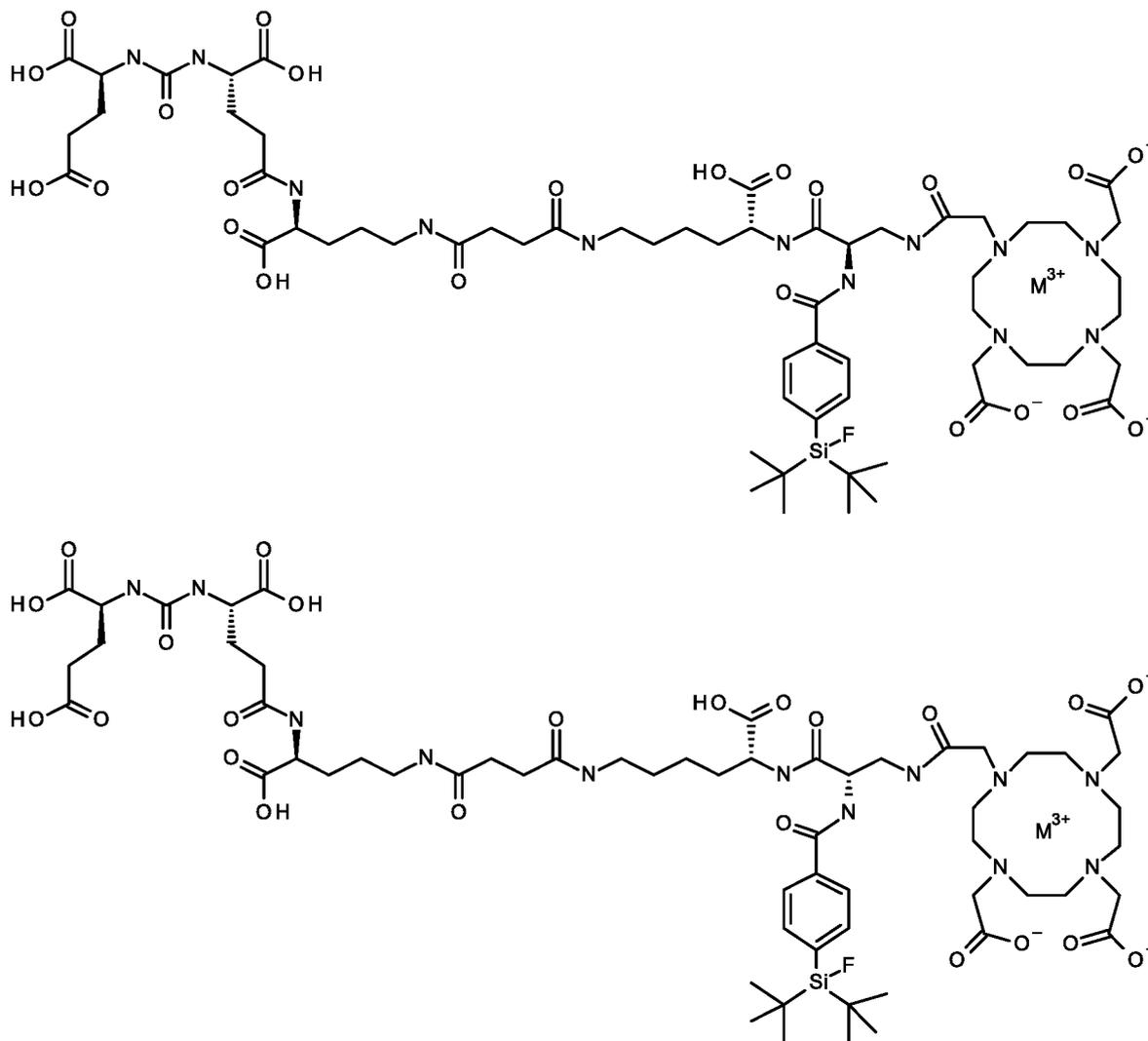
PSMA-SIFA 11



и их изомеры:







Предпочтительные схемы мечения для указанных наиболее предпочтительных соединений раскрыты в данном документе выше.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для визуализации, содержащей или состоящей из одного или более конъюгатов или соединений по настоящему изобретению, раскрытых в данном документе выше.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к диагностической композиции, содержащей или состоящей из одного или более конъюгатов или соединений по настоящему изобретению, раскрытых в данном документе выше.

Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты и/или разбавители. Примеры подходящих фармацевтических носителей, эксципиентов и/или разбавителей хорошо известны в данной области техники и включают фосфатно-солевые буферы, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы и т.д. Композиции, содержащие такие носители, могут быть получены общеизвестными

общепринятыми способами. Такие фармацевтические композиции можно вводить субъекту в подходящей дозе. Введение подходящих композиций может осуществляться различными способами, например, путем внутривенного, внутривенного, подкожного, внутримышечного, местного, внутрикожного, интраназального или интробронхиального введения. Особенно предпочтительно, указанное введение осуществляют путем инъекции и/или доставки, например, в участок поджелудочной железы, или в мозговую артерию, или непосредственно в ткань мозга. Композиции также можно вводить непосредственно в целевой сайт, например, путем биолиственной доставки к внешнему или внутреннему целевому сайту, например, в поджелудочной железе или мозгу. Режим дозирования определяется лечащим врачом и клиническими факторами. Как хорошо известно в области медицины, дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, включая параметры пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное вводимое соединение, пол, время и способ введения, общее состояние здоровья и учет других лекарственных средств, применяемых одновременно. Количество фармацевтически активного вещества может составлять от 0,1 нг до 10 мг/кг массы тела на дозу, однако, предусмотрены дозы ниже или выше указанного примерного диапазона, особенно с учетом вышеупомянутых факторов.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к одному или более соединениям по настоящему изобретению, раскрытым в данном документе выше, для применения в диагностической медицине.

Предпочтительное применение в медицине представляет собой применение в области ядерной медицины, например, ядерная диагностическая визуализация, также называемая ядерно-молекулярной визуализацией, и/или таргетная лучевая терапия заболеваний, связанных со сверхэкспрессией, предпочтительно PSMA на пораженной ткани.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к соединению по настоящему изобретению, раскрытому в данном документе выше, для применения в способе диагностики и/или определения стадии ракового заболевания, предпочтительно рака предстательной железы. Рак предстательной железы представляет собой не единственный вид ракового заболевания, при котором наблюдают экспрессию PSMA. Раковое заболевание, не относящееся к предстательной железе, при котором наблюдают экспрессию PSMA, включает рак молочной железы, легких, колоректальный и почечно-клеточный рак. Таким образом, любое раскрытое в данном документе соединение, содержащее PSMA-связывающий фрагмент, можно применять в диагностике,

визуализации или лечении ракового заболевания, характеризующегося экспрессией PSMA.

Предпочтительные показания представляют собой обнаружение или определение стадии ракового заболевания, такого как, но не ограничиваясь ими, глиома высокой степени злокачественности, рак легких и особенно рак предстательной железы и метастазирующий рак предстательной железы, выявление метастатического заболевания у пациентов с первичным раком предстательной железы от промежуточного риска до высокого риска, и выявление метастатических участков даже при низких значениях PSA в сыворотке у пациентов с биохимически рецидивирующим раком предстательной железы. Другим предпочтительным показанием является визуализация и визуализация неоангиогенов.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к конъюгату или соединению по настоящему изобретению, раскрытых в данном документе выше, для применения в способе диагностики и/или определения стадии ракового заболевания, предпочтительно рака предстательной железы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1: Примерное соотношение определения девяти эталонных веществ в OriginPro 2016G.

Фигура 2a: Контроль качества $[^{19}\text{F}][\text{natGa}]\text{-rhPSMA7-гac}$ ($[^{19}\text{F}][\text{natGa}]\text{D/L-Dap-R/S-DOTAGA-rhPSMA-7-гac}$), (партия 10, предшественник для получения ($[^{18}\text{F}][\text{natGa}]\text{D/L-Dap-R/S-DOTAGA-rhPSMA-7}$ в отделении ядерной медицины, Мюнхенский технический университет). Условия ВЭЖХ: растворитель А: $\text{H}_2\text{O} + 0,1\% \text{ТФУ}$ (трифторуксусная кислота), растворитель В: $\text{MeCN} + 0,1\% \text{ТФУ}$. Градиент: от 25 до 35% В от 0 до 40 мин, от 95 до 95% В от 40 до 45 мин, от 35 до 35% В от 45 до 50 мин, поток: 1 мл/мин, колонка: Nucleosil 100-5 C^{18} , $125 \times 4,6$ мм, образец: 1 ммоль/л (ДМСО (диметилсульфоксид)), 10 мкл.

Фигура 2b: Назначение пиков: D-Dap-R-DOTAGA-rhPSMA-7.1 rhPSM7-гac из фиг. 2a, совместно инъецированный с энантиомерно чистым D-Dap-R-DOTAGA-rhPSMA-7.1. Условия ВЭЖХ: растворитель А: $\text{H}_2\text{O} + 0,1\% \text{ТФУ}$, Растворитель В: $\text{MeCN} + 0,1\% \text{ТФУ}$. Градиент: от 25 до 35% В от 0 до 40 мин, от 95 до 95% В от 40 до 45 мин, от 35 до 35% В от 45 до 50 мин, поток: 1 мл/мин, колонка: Nucleosil 100-5 C^{18} , $125 \times 4,6$ мм, образец: 1 ммоль/л (ДМСО), 10 мкл.

Фигура 2c: Профиль ВЭЖХ D-Dap-R-DOTAGA-rhPSMA-7.1. Условия ВЭЖХ: растворитель А: $\text{H}_2\text{O} + 0,1\% \text{ТФУ}$, растворитель В: $\text{MeCN} + 0,1\% \text{ТФУ}$. Градиент: от 25 до 35% В от 0 до 40 мин, от 95 до 95% В от 40 до 45 мин, от 35 до 35% В от 45 до 50 мин,

поток: 1 мл/мин, колонка: Nucleosil 100-5 C¹⁸, 125 × 4,6 мм, образец: 1 ммоль/л (ДМСО), 10 мкл.

Фигура 3а. Назначение пиков: L-Dар-R-DOTAGA-rhPSMA-7.2 rhPSM7-гас из фиг. 2а, совместно инъецированный с энантиомерно чистым L-Dар-R-DOTAGA-rhPSMA-7.2. Условия ВЭЖХ: растворитель А: Н₂О + 0,1% ТФУ, Растворитель В: MeCN + 0,1% ТФУ. Градиент: от 25 до 35% В от 0 до 40 мин, от 95 до 95% В от 40 до 45 мин, от 35 до 35% В от 45 до 50 мин, поток: 1 мл/мин, колонка: Nucleosil 100-5 C¹⁸, 125 × 4,6 мм, образец: 1 ммоль/л (ДМСО), 10 мкл.

Фигура 3б: Профиль ВЭЖХ L-Dар-R-DOTAGA-rhPSMA-7.2 Условия ВЭЖХ: растворитель А: Н₂О + 0,1% ТФУ, Растворитель В: MeCN + 0,1% ТФУ. Градиент: от 25 до 35% В от 0 до 40 мин, от 95 до 95% В от 40 до 45 мин, от 35 до 35% В от 45 до 50 мин, поток: 1 мл/мин, колонка: Nucleosil 100-5 C¹⁸, 125 × 4,6 мм, образец: 1 ммоль/л (ДМСО), 10 мкл.

Фигура 4а: Назначение пиков: D-Dар-S-DOTAGA-rhPSMA-7.3 rhPSM7-гас из фиг. 2а, совместно инъецированный с энантиомерно чистым D-Dар-S-DOTAGA-rhPSMA-7.3. Условия ВЭЖХ: растворитель А: Н₂О + 0,1% ТФУ, Растворитель В: MeCN + 0,1% ТФУ. Градиент: от 25 до 35% В от 0 до 40 мин, от 95 до 95% В от 40 до 45 мин, от 35 до 35% В от 45 до 50 мин, поток: 1 мл/мин, колонка: Nucleosil 100-5 C¹⁸, 125 × 4,6 мм, образец: 1 ммоль/л (ДМСО), 10 мкл.

Фигура 4б: Профиль ВЭЖХ D-Dар-D-DOTAGA-rhPSMA-7.3 Условия ВЭЖХ: растворитель А: Н₂О + 0,1% ТФУ, Растворитель В: MeCN + 0,1% ТФУ. Градиент: от 25 до 35% В от 0 до 40 мин, от 95 до 95% В от 40 до 45 мин, от 35 до 35% В от 45 до 50 мин, поток: 1 мл/мин, колонка: Nucleosil 100-5 C¹⁸, 125 × 4,6 мм, образец: 1 ммоль/л (ДМСО), 10 мкл.

Фигура 5а. Назначение пиков: L-Dар-S-DOTAGA-rhPSMA-7.4 rhPSM7-гас из фиг. 2а, совместно инъецированный с энантиомерно чистым D-Dар-S-DOTAGA-rhPSMA-7.3. Условия ВЭЖХ: растворитель А: Н₂О + 0,1% ТФУ, Растворитель В: MeCN + 0,1% ТФУ. Градиент: от 25 до 35% В от 0 до 40 мин, от 95 до 95% В от 40 до 45 мин, от 35 до 35% В от 45 до 50 мин, поток: 1 мл/мин, колонка: Nucleosil 100-5 C¹⁸, 125 × 4,6 мм, образец: 1 ммоль/л (ДМСО), 10 мкл.

Фигура 5б: Профиль ВЭЖХ L-Dар-D-DOTAGA-rhPSMA-7.4. Условия ВЭЖХ: растворитель А: Н₂О + 0,1% ТФУ, растворитель В: MeCN + 0,1% ТФУ. Градиент: от 25 до 35% В от 0 до 40 мин, от 95 до 95% В от 40 до 45 мин, от 35 до 35% В от 45 до 50 мин, поток: 1 мл/мин, колонка: Nucleosil 100-5 C¹⁸, 125 × 4,6 мм, образец: 1 ммоль/л (ДМСО), 10 мкл.

Фигура 6a: Аффинность связывания (IC_{50} [нмоль/л]) rhPSMA7.1 и 7.2 с PSMA. Аффинность определяли с применением клеток LNCaP (150000 клеток/лунку) и ((4-[^{125}I]иодбензоил)KuE ([^{125}I]IB-KuE, $c = 0,2$ нмоль/л) в качестве радиолиганда (1 час, 4 °C, HBSS + 1 % БСА). Данные выражены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (SD) ($n = 3$, в 3 различных экспериментах).

Фигура 6b: Определение аффинности связывания [нмоль/л] изомеров rhPSMA7 с PSMA. Каждый из четырех столбцов показывает индивидуальные измерения аффинности для rhPSMA7.1 (слева) к rhPSMA7.4 (справа). Условия являются такими, как описано для фиг. 6a.

Фигура 7: Изображение отдельных измерений IC_{50} [нмоль/л], показанных на фиг. 6a и 6b. Значение номер 5 rhPSMA7.1 удалено. Условия являются такими, как описано для фиг. 6a.

Фигура 8: Изображение отдельных измерений интернализации [% от [^{125}I]IB-KuE]. Интернализированное активное вещество ($c = 0,5$ нмоль/л) через 1 час в % от эталонного лиганда ([^{125}I]I-BA)KuE ($c = 0,2$ нмоль/л), определенное на клетках LNCaP (37 °C, DMEM F12 + 5% БСА, 125000 клеток/лунку). Данные скорректированы на неспецифическое связывание (10 мкмоль РМРА) и выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 3$).

Фигура 9: Изображение отдельных измерений $\log P$ изомеров rhPSMA.

Фигура 10: Биораспределение (в % ID/г) меченых ^{18}F меток rhPSMA через 1 час p.i у мышей SCID, несущих опухоль LNCaP. Данные выражены как среднее \pm стандартное отклонение ($n = 4$ для rhPSMA7.1, $n = 5$ для 7.2, $n = 4$ для 7.3, $n = 5$ для 7.4 и $n = 3$ для 7-gac).

Фигура 11: Биораспределение [% ID/г] ^{18}F -rhPSMA, совместно инъецированных с РМРА (8 мг/кг) через 1 час после инъекции у мышей SCID, несущих опухоль LNCaP. Данные выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 3$).

Фигура 12: Возможные виды, образованные метаболическим расщеплением амидных связей. iL: при расщеплении образуется вид с повышенной липофильностью, DF: дефторирование, nd: не обнаружено, т.к. не радиоактивен.

Фигура 13: Слева: графический анализ перекрывающихся пиков 1 (rhPSMA7.2) и 2 (rhPSMA7.3), справа: деконволюция и интеграция профилей пиков с помощью Systat PeakFit Software), сверху: выровненные экспериментальные данные, внизу: отдельные пики после деконволюции.

Фигура 14a: Количественная оценка относительных изменений (в % изменения введенной рацемической смеси) для оценки воспроизводимости классической интеграции

(с помощью программы ВЭЖХ) и деконволюции (с помощью "PeakFit") пика 4 (rhPSMA7.1). Оба способа демонстрируют одинаковую производительность для этого пика.

Фигура 14b: Количественная оценка относительных изменений (в % изменения введенной рацемической смеси) для оценки воспроизводимости классической интеграции (с помощью программы ВЭЖХ) и деконволюции (с помощью "PeakFit") пика 3 (rhPSMA7.4). Оба способа демонстрируют одинаковую производительность для этого пика.

Фигура 15: Процентное изменение каждого изомера rhPSAM7.1-7.4 в крови, печени, почках, опухоли и моче по отношению к его доле во введенном растворе ($[^{18}\text{F}][^{\text{nat}}\text{Ga}]\text{rhPSMA7-гac}$). Данные выражены в виде средних значений \pm стандартное отклонение ($n = 4$, см. также фиг. 16).

Фигура 16: Процентное изменение каждого изомера rhPSAM7.1-7.4 для каждого образца и эксперимента) в крови, печени, почках, опухоли и моче по отношению к его доле во введенном растворе ($[^{18}\text{F}] [^{\text{nat}}\text{Ga}] \text{rhPSMA7-гac}$). Анализы проводились с помощью Systat PeakFit.

Фигура 17: Слева: профиль сканера ТСХ планшета для ТСХ с образцом печени (30.07.2018, общее количество имп: 142 имп). Вследствие их плохой статистики и ограниченной достоверности серия данных с имп менее 200 была удалена. Справа: фотоизображение планшета для ТСХ с образцом печени: длинный хвост движущейся метки.

Фигура 18: Слева: профиль сканера ТСХ планшета для ТСХ с образцом контроля качества (КК) (01.08.2018, общее количество имп: 384). Справа: типичное фотоизображение планшета для ТСХ с образцом мочи, почек, печени, опухоли, крови и КК.

Фигура 19: Радио-ТСХ $[\text{F-18}] \text{rhPSMA7-гac}$ (30.07.20¹⁸) в рамках контроля качества в отделении ядерной медицины перед клиническим применением метки. Обратите внимание, что след меченного вещества наблюдается даже в буфере для композиции (и, следовательно, в отсутствие белков).

Фигура 20: Количественное определение свободного $[\text{F-18}]$ фторида и "интактного" $[\text{F-18}]\text{rhPSMA7-гac}$ с помощью радио-ТСХ образца мочи (30.07.2018).

Фигура 21: Слева: анализ с помощью радио-ВЭЖХ мочи, собранной и объединенной от 4 нормальных мышей, которым инъецировали соответствующую метку $[\text{F-18}]\text{rhPSAM-7.x}$. Справа: радио-ВЭЖХ анализ "холодной" мочи с добавлением соответствующей метки $[\text{F-18}] \text{rhPSAM-7.x}$ в течение 1 часа (7.1, 7.2), 0,5 часа (7.3) и 2

часов (7.4). Условия ВЭЖХ: растворитель А: H_2O + 0,1% ТФУ, растворитель В: MeCN + 0,1% ТФУ, Градиент: 5% изократический от 0 до 3 мин, от 25 до 35% В от 3 до 43 мин, от 95 до 95% В от 43 до 48 мин, поток: 1 мл/мин, колонка: Nucleosil 100-5 C18, $125 \times 4,6$ мм.

Фигура 22: Разделение радиоактивных веществ в моче фиксацией картриджа и ТСХ. Вверху: анализ мочи с помощью радио-ВЭЖХ 30 мин после инъекции $[\text{F-18}]\text{rhPSMA7.3}$ у мышей, показывающих небольшую долю через 1,6 мин и интактную метку приблизительно через 34,5 мин. Внизу (слева): мочу мышей, 30 мин после инъекции $[\text{F-18}]\text{rhPSMA7.3}$, разбавляли и подвергали фиксации картриджем STRATA-X. Картридж промывали и элюировали смесью MeCN/вода (60/40 об./об. + 1% ТФУ), обнаружена только интактная метка. Внизу (справа): как проскок при фиксации картриджа (не удерживаемые компоненты), так и фракция, окончательно элюированная MeCN/водой из картриджа, были проанализированы с помощью ТСХ (внизу, справа). В то время как 96,1% $[\text{F-18}]\text{rhPSMA7.3}$ и только 3,9% $[\text{F-18}]\text{фторида}$ были обнаружены в элюате картриджа, обратное соотношение было обнаружено в проскоке картриджа (3,4% $[\text{F-18}]\text{rhPSMA7.3}$ и только 96,6% $[\text{F-18}]\text{фторида}$).

Фигура 23: К свежей и нерадиоактивной моче мышей добавляли $[\text{F-18}]\text{rhPSMA7.3}$, а затем 0,5 мкмоль холодного F-19-фторида, инкубировали в течение 2 ч. Радиоактивное вещество было полностью (98,5%) преобразовано в очень гидрофильную фракцию, представляющую собой $[\text{F-18}]\text{фторид}$ (пик на 1,6 мин). Примечание: пик на 1,6 мин впоследствии был иммобилизован на картридже QMA и элюирован NaCl (1M) (= фторид).

Фигура 24: Клиническое биораспределение и накопление в опухолевых поражениях $^{18}\text{F-rhPSMA-7}$ (слева) и $^{18}\text{F-rhPSMA-7.3}$ (справа), как продемонстрировано с помощью показателя SUV_{макс} (стандартизованный показатель накопления). Данные выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Фигура 25: Клиническое биораспределение и накопление в опухолевых поражениях $^{18}\text{F-rhPSMA-7}$ (слева) и $^{18}\text{F-rhPSMA-7.3}$ (справа), как продемонстрировано с помощью показателя SUV_{среднее}. Данные выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Фигура 26. Клиническое биораспределение и накопление $^{18}\text{F-rhPSMA-7}$ (слева) и $^{18}\text{F-rhPSMA-7.3}$ (справа) в опухолевых поражениях, как продемонстрировано отношением SUV_{макс} к фону. Данные выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Фигура 27: Клиническое биораспределение и накопление $^{18}\text{F-rhPSMA-7}$ (слева) и $^{18}\text{F-rhPSMA-7.3}$ (справа) в опухолевых поражениях, как продемонстрировано отношением SUV_{среднее} к фону. Данные выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Фигура 28: Два клинических примера ПЭТ-визуализации $^{18}\text{F-rhPSMA-7.3}$.

Настоящее изобретение проиллюстрировано соответствующими примерами.

Пример 1: материалы и способы

Fmoc-(9-флуоренилметоксикарбонил-) и все другие защищенные аналоги аминокислот приобретали у Bachem (Бубендорф, Швейцария) или Iris Biotech (Марктревиц, Германия). Полистирольную смолу на основе тритилхлорида (TCP) приобретали у PerChem (Тюбинген, Германия). У Chematech (Дижон, Франция) приобретали хелаторы DOTAGA-ангидрид, (R)-DOTA-GA(tBu)₄ и (S)-DOTA-GA(tBu)₄. Все необходимые растворители и другие органические реагенты приобретали у компаний Alfa Aesar (Карлсруэ, Германия), Sigma-Aldrich (Мюнхен, Германия) или VWR (Дармштадт, Германия). Твердофазный синтез пептидов проводили вручную с применением встряхивающего устройства для шприцев Intelli-Mixer (Neolab, Гейдельберг, Германия). Аналитическую и препаративную обращенно-фазовую хроматографию высокого давления (ОФ-ВЭЖХ) выполняли с применением градиентных систем Shimadzu (Shimadzu Deutschland GmbH, Нойфарн, Германия), каждая из которых оснащена детектором в ультрафиолетовой и видимой области спектра (PDA) SPD-20A (220 нм, 254 нм). Колонку Nucleosil 100 C18 (125 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм) (CS GmbH, Лангервез, Германия) применяли для аналитических измерений при скорости потока 1 мл/мин. В тексте приведены как конкретные градиенты, так и соответствующие значения времени удерживания t_R . Очистку препаративной ВЭЖХ проводили на колонке Multospher 100 RP18 (250 × 10 мм, размер частиц 5 мкм) (CS GmbH, Лангервез, Германия) при постоянной скорости потока 5 мл/мин. Аналитическую и препаративную радио-ОФ-ВЭЖХ выполняли с применением колонки Nucleosil 100 C18 (5 мкм, 125 × 4,0 мм) (CS GmbH, Лангервез, Германия). В качестве элюентов для всех операций ВЭЖХ применяли воду (растворитель А) и ацетонитрил (растворитель В), оба содержали 0,1% трифторуксусной кислоты. Масс-спектры с ионизацией электрораспылением для характеристики веществ получали на масс-спектрометре ExpressL CMS (Advion Ltd., Харлоу, Великобритания). Спектры ЯМР регистрировали на спектрометрах Bruker AVHD-300 или AVHD-400 при 300 К. Значения pH измеряли с помощью pH-метра SevenEasy (Mettler Toledo, Gießen, Германия).

Протоколы получения

1) Твердофазный пептидный синтез согласно Fmoc-стратегии.

Загрузка TCP-смолы (GP1)

Загрузку полистирольной смолы на основе тритилхлорида (TCP) с Fmoc-защищенной аминокислотой (AA) осуществляли путем перемешивания раствора TCP-

смолы (1,95 ммоль/г) и Fmoc-AA-OH (1,5 экв.) в безводном ДХМ (дихлорметан) с DIPEA (диизопропилэтиламин) (4,5 экв.) при комнатной температуре в течение 2 часов. Оставшийся тритилхлорид блокировали добавлением метанола (2 мл/г смолы) в течение 15 минут. Затем смолу фильтровали и промывали ДХМ (2×5 мл/г смолы), ДМФА (диметилформамид) (2×5 мл/г смолы), метанолом (5 мл/г смолы) и сушили в вакууме. Конечную загрузку Fmoc-AA-OH определяли по следующему уравнению:

$$l \left[\frac{\text{ммоль}}{\text{г}} \right] = \frac{(m_2 - m_1) \times 1000}{(M_W - M_{HCl}) m_2}$$

где

m_2 = масса загруженной смолы [г]

m_1 = масса выгруженной смолы [г]

M_W = молекулярная масса AA [г/моль]

M_{HCl} = молекулярная масса HCl [г/моль]

Образование амидной связи на смоле (GP2)

Для конъюгации структурного элемента со связанным со смолой пептидом смесь TBTU (трибутилтиомочевина) и НОВТ (гидроксibenзотриазол) применяли для предварительной активации DIPEA или 2,4,6-триметилпиридином в качестве основания в ДМФА (10 мл/г смолы) в течение 5 мин. Точная стехиометрия и время реакции для каждой стадии конъюгации указаны в протоколе получения. После реакции смолу промывали ДМФА (6×5 мл/г смолы).

Снятие защиты Fmoc на смоле (GP3)

Связанный со смолой Fmoc-пептид обрабатывали 20% пиперидином в ДМФА (об./об., 8 мл/г смолы) в течение 5 минут, а затем в течение 15 минут. После этого смолу тщательно промывали ДМФА (8×5 мл/г смолы).

Снятие защиты Dde на смоле (GP4)

Dde-защищенный пептид (1,0 экв.) растворяли в растворе 2% моногидрата гидразина в ДМФА (об./об., 5 мл/г смолы) и встряхивали в течение 20 мин (GP4a). В случае присутствующих Fmoc-групп снятие защиты Dde проводили путем добавления раствора имидазола (0,92 г/г смолы), гидрохлорида гидроксиламина (1,26 г/г) в н-метил-2-пирролидоне (5,0 мл) и ДМФА (1,0 мл) в течение 3 ч при комнатной температуре (GP4b). После снятия защиты смолу промывали ДМФА (8×5 мл/г смолы).

Отщепление пептида от смолы с одновременным снятием защиты с кислотонеустойчивых защитных групп (GP 5)

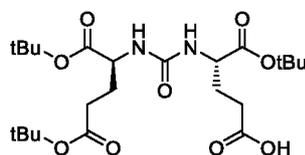
Полностью защищенный связанный со смолой пептид растворяли в смеси ТФУ/TIPS/вода (об./об./об., 95/2,5/2,5) и встряхивали в течение 30 мин. Раствор фильтровали и смолу обрабатывали таким же образом еще 30 мин. Оба фильтрата объединяли, дополнительно перемешивали еще 5 ч и концентрировали в потоке азота. После растворения остатка в смеси трет-бутанола и воды и последующей лиофилизации получали неочищенный пептид.

^{nat}Ga-комплексообразование (GP6)

Для образования комплекса с ^{nat}Ga пептид (1,0 экв.) растворяли в смеси 3:1 (об./об.) TBuOH в H₂O и добавляли водный раствор Ga(NO₃)₃ (3,5 экв.). После нагревания полученной смеси в течение 30 минут при 75 °С пептид очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ.

2) Получение связывающего мотива PSMA

Glu-мочевина-Glu ((tBuO)EuE(OtBu)₂)



tBu-защищенный связывающий мотив Glu-мочевина-Glu (EuE) получали в соответствии с ранее описанным способом (схема 1) для tBu-защищенного Glu-мочевины-Lys (EuK) (Weineisen, M.; Simecek, J.; Schottelius, M.; Schwaiger, M.; Wester, H. J., Synthesis and preclinical evaluation of DOTAGA-conjugated PSMA ligands for functional imaging and endoradiotherapy of prostate cancer. EJNMMI research 2014, 4 (1), 63).

Ди-трет-бутил (1H-имидазол-1-карбонил)-L-глутамат (i)

Раствор ДХМ, содержащий 2,0 г (7,71 ммоль, 1,0 экв.) I-ди-трет-бутил-L-глутамат-HCl, охлаждали на льду в течение 30 минут и затем обрабатывали 2,69 мл ТЭА (19,28 ммоль, 2,5 экв.) и 3,3 мг (0,3 ммоль, 0,04 экв.) DMAP. После добавления при постоянном перемешивании в течение 5 минут медленно добавляли 1,38 г (8,84 ммоль, 1,1 экв.) 1,1'-карбонилдиимидазола (CDI), растворенного в ДХМ, в течение 30 минут. Реакционную смесь дополнительно перемешивали в течение ночи и давали ей нагреться до комнатной температуры. Реакцию останавливали, применяя 8 мл насыщенного NaHCO₃, с сопутствующими стадиями промывки водой (2×) и солевым раствором (2×) и сушили над Na₂SO₄. Оставшийся растворитель удаляли в вакууме и неочищенный продукт (S)-Ди-трет-бутил 2-(1H-имидазол-1-карбоксамидо)пентандиоат (i) применяли без дополнительной очистки.

5-бензил 1-(трет-бутил) (((S)-1,5-ди-трет-бутокси-1,5-диоксопентан-2-ил)карбамоил)-L-глутамат (ii)

2,72 г (7,71 ммоль, 1,0 экв.) неочищенного продукта (S)-Di-трет-бутил-2-(1H-имидазол-1-карбоксамидо)пентандиоата (i) растворяли в 1,2-дихлорэтаноле (ДХЭ) и охлаждали на льду 30 мин. К этому раствору добавляли 2,15 мл (15,42 ммоль, 2,0 экв.) ТЭА и 2,54 г (7,71 ммоль, 1,0 экв.) H-L-Glu(OBzl)-OtBu·HCl и раствор перемешивали в течение ночи при 40 °С. Оставшийся растворитель выпаривали и неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле со смесью элюентов, содержащей этилацетат/гексан/ТЭА (500:500:0,8, об./об./об.). После удаления растворителя 5-бензил-1-(трет-бутил)-(((S)-1,5-ди-трет-бутокси-1,5-диоксопентан-2-ил)карбамоил)-L-глутамат (ii) получали в виде бесцветного масла.

(tBuO)EuE(OtBu)₂ (iii)

Для получения (tBuO)EuE(OtBu)₂, 3,17 г (5,47 ммоль, 1,0 экв.) 5-бензил-1-(трет-бутил)-(((S)-1,5-ди-трет-бутокси-1,5-диоксопентан-2-ил)карбамоил)-L-глутамата (ii) растворяли в 75 мл EtOH и к этому раствору добавляли 0,34 г (0,57 ммоль, 0,1 экв.) палладия на активированном угле (10%). Колбу, содержащую реакцию смесь, сначала продували H₂, и раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре и легком давлении H₂ (баллон). Неочищенный продукт очищали через целит и растворитель упаривали в вакууме. Продукт (iii) получали в виде гигроскопичного твердого вещества (84%). ВЭЖХ (от 10% до 90% В за 15 мин): t_R = 11,3 мин. Расчетная моноизотопная масса (C₂₃H₄₉N₂O₉): 488,3, найдено: m/z = 489,4 [M+H]⁺, 516,4 [M+Na]⁺.

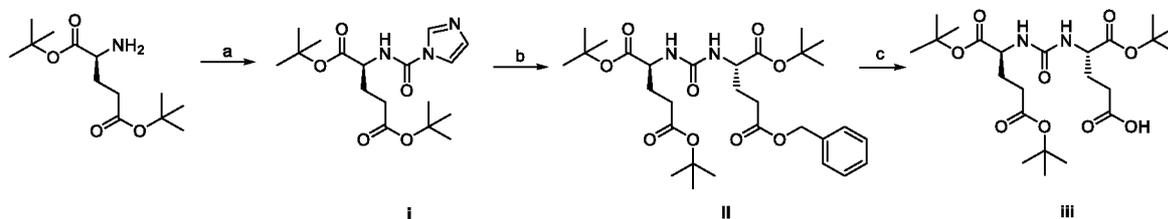
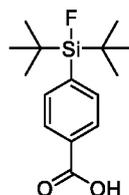


Схема 1. Получение (tBuO)EuE(OtBu)₂: а) DCI, ТЭА (триэтанолламин), DMAP (ДХМ), б) H-L-Glu(OBzl)-OtBu·HCl, ТЭА (ДХЭ), в) Pd/C (10%), H₂ (EtOH).

3) Получение акцептора кремнефторида.

4-(ди-трет-бутилфторсилил)бензойная кислота (SiFA-BA)



SiFA-BA получали по ранее описанному способу (схема 2) (Iovkova, L.; Wangler, B.; Schirmacher, E.; Schirmacher, R.; Quandt, G.; Boening, G.; Schurmann, M.; Jurkschat, K., para-Functionalized aryl-di-tert-butylfluorosilanes as potential labeling synthons for (18)F

radiopharmaceuticals. Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany) 2009, 15 (9), 2140-7). Все реакции проводили в высушенных реакционных сосудах в атмосфере аргона с применением вакуумного газового коллектора.

((4-бромбензил)окси)(трет-бутил)диметилсилан (i)

К перемешиваемому раствору 4-бромбензилового спирта (4,68 г, 25,0 ммоль, 1,0 экв.) в безводном ДМФА (70 мл) добавляли имидазол (2,04 г, 30,0 ммоль, 1,2 экв.) и TBDMSCl (4,52 г, 30,0 ммоль, 1,2 экв.), и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Затем смесь выливали в ледяную H₂O (250 мл) и экстрагировали Et₂O (5 × 50 мл). Объединенные органические фракции промывали насыщ. водным NaHCO₃ (2 × 100 мл) и солевым раствором (100 мл), сушили, фильтровали и концентрировали в вакууме, получая неочищенный продукт, который очищали колоночной флэш-хроматографией (диоксид кремния, 5% EtOAc/бензин), получая продукт i в виде бесцветного масла (7,18 г, 95%). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ [м.д.] = 0,10 (6H, s, SiMe₂t-Bu), 0,95 (9H, s, SiMe₂tBu), 4,69 (2H, s, CH₂OSi), 7,21 (2H, d), 7,46 (2H, d). ВЭЖХ (от 50 до 100% В за 15 мин): t_R = 15 мин.

Ди-трет-бутил{4-[(трет-бутилдиметилсилилокси)метил]фенил}фторсилан (ii)

При -78 °C и при перемешивании с помощью магнитной мешалки раствор tBuLi в пентане (7,29 мл, 1,7 моль/л, 12,4 ммоль, 2,4 экв.) добавляли к раствору ((4-бромбензил)окси)(трет-бутил)диметилсилана (i) (1,56 г, 5,18 ммоль, 1,0 экв.) в сухом ТГФ (15 мл). После перемешивания реакционной смеси в течение 30 мин при -78 °C полученную суспензию по каплям в течение 30 мин добавляли к охлажденному (-78 °C) раствору ди-трет-бутилдифторсилана (1,12 г, 6,23 ммоль, 1,2 экв.) в сухом ТГФ (10 мл). Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры в течение 12 часов, а затем гидролизовали насыщенным водным раствором NaCl (100 мл). Органический слой отделяли, а водный слой экстрагировали диэтиловым эфиром (3 × 50 мл). Объединенные органические слои сушили над сульфатом магния и фильтровали. Фильтрат концентрировали в вакууме, получая продукт ii в виде желтоватого масла (1,88 г, 95%). Его применяли для последующих реакций без дополнительной очистки. Спектры ЯМР соответствуют литературным данным (Iovkova, L.; Wangler, B.; Schirmacher, E.; Schirmacher, R.; Quandt, G.; Boening, G.; Schurmann, M.; Jurkschat, K., para-Functionalized aryl-di-tert-butylfluorosilanes as potential labeling synthons for (18)F radiopharmaceuticals. Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany) 2009, 15 (9), 2140-7). ВЭЖХ (от 50 до 100% В за 20 мин): t_R = 19 мин.

4-(Ди-трет-бутилфторсиланил)бензиловый спирт (iii)

Каталитическое количество концентрированной водной HCl (0,5 мл) добавляли к суспензии ii (1,88 г, 4,92 ммоль, 1,0 экв.) в метаноле (50 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 18 часов при комнатной температуре, а затем растворитель и летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Остаток повторно растворяли в диэтиловом эфире (40 мл) и раствор промывали насыщенным водным раствором NaHCO₃. Водный слой экстрагировали диэтиловым эфиром (3 × 50 мл). Объединенные органические слои сушили над сульфатом магния и фильтровали. Фильтрат концентрировали в вакууме, получая продукт iii в виде желтоватого масла (1,29 г, 98%), которое затвердевало. Продукт применяли без дополнительной очистки. Спектры ЯМР соответствуют литературным данным (Iovkova, L.; Wangler, B.; Schirmacher, E.; Schirmacher, R.; Quandt, G.; Boening, G.; Schurmann, M.; Jurkschat, K., para-Functionalized aryl-di-tert-butylfluorosilanes as potential labeling synthons for (18)F radiopharmaceuticals. Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany) 2009, 15 (9), 2140-7). ВЭЖХ (от 50 до 100% В за 15 мин): t_R = 8,2 мин.

4-(ди-трет-бутилфторсилил) бензальдегид (iv)

Раствор спирта iii (1,37 г, 5,10 ммоль, 1,0 экв.) в сухом дихлорметане (20 мл) добавляли по каплям к перемешиваемой охлажденной льдом суспензии хлорхромата пиридиния (2,75 г, 12,8 ммоль, 2,5 экв.) в сухом дихлорметане (60 мл). После перемешивания реакционной смеси в течение 30 минут при 0 °С и в течение 2,5 часов при комнатной температуре добавляли безводный диэтиловый эфир (40 мл) и раствор супернатанта декантировали с черного смолистого материала. Нерастворимый материал тщательно промывали диэтиловым эфиром, и объединенные органические фазы пропускали через короткий слой силикагеля (10 см на г неочищенного продукта) для фильтрации. Растворители удаляли в вакууме, получая альдегид iv в виде желтоватого масла (1,31 г, 96%). Спектры ЯМР соответствуют литературным данным (Iovkova, L.; Wangler, B.; Schirmacher, E.; Schirmacher, R.; Quandt, G.; Boening, G.; Schurmann, M.; Jurkschat, K., para-Functionalized aryl-di-tert-butylfluorosilanes as potential labeling synthons for (18)F radiopharmaceuticals. Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany) 2009, 15 (9), 2140-7). ВЭЖХ (от 50 до 100% В за 15 мин): t_R = 10,5 мин.

4-(Ди-трет-бутилфторсилил)бензойная кислота (v)

При комнатной температуре 1 моль/л водный KMnO₄ (30 мл) добавляли к смеси iv (1,31 г, 4,92 ммоль, 1,0 экв.), трет-бутанола (30 мл), дихлорметана (3,3 мл) и 1,25 моль/л буфера NaH₂PO₄·H₂O (20 мл) при значении pH от 4,0 до 4,5. После перемешивания смеси в течение 25 минут ее охлаждали до 5 °С, после чего добавляли избыток KMnO₄ (0,78 г, 4,92 ммоль, 1,0 экв.). Затем реакцию гасили добавлением насыщенного водного раствора

Na_2SO_3 (50 мл). При добавлении 2 моль/л водной HCl весь MnO_2 растворялся. Полученный раствор экстрагировали диэтиловым эфиром (3×100 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным водным раствором NaHCO_3 , сушили над MgSO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением белого твердого вещества, которое очищали перекристаллизацией из $\text{Et}_2\text{O}/n$ -гексана (1:3, в течение 12 часов) с получением продукта **v** (0,84 г, 60%). Спектры ЯМР соответствуют литературным данным (Iovkova, L.; Wangler, B.; Schirmmayer, E.; Schirmmayer, R.; Quandt, G.; Boening, G.; Schurmann, M.; Jurkschat, K., para-Functionalized aryl-di-tert-butylfluorosilanes as potential labeling synthons for (^{18}F) radiopharmaceuticals. Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany) 2009, 15 (9), 2140-7). ВЭЖХ (от 50 до 100% В за 15 мин): $t_R = 8,5$ мин.

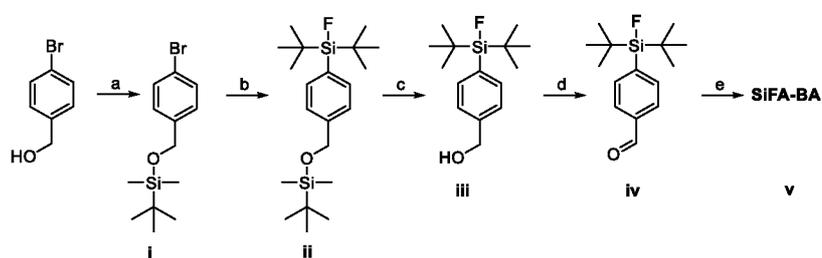
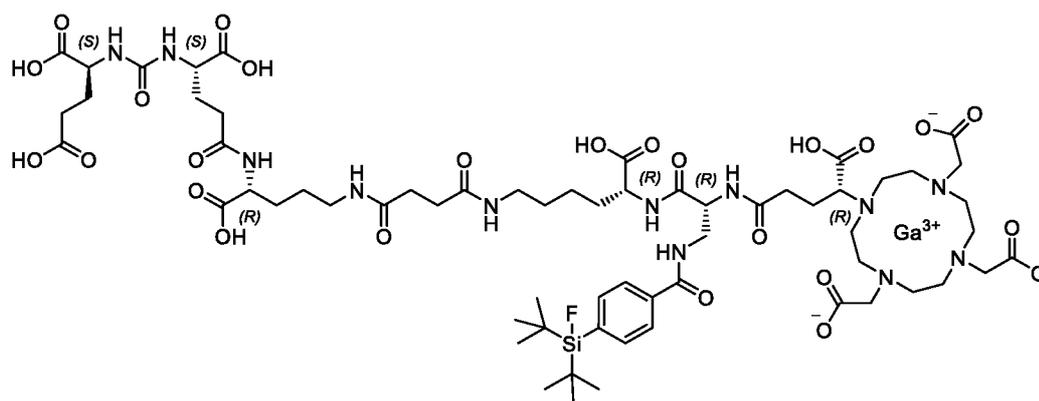


Схема 2. Получение SiFA-BA: а) TBDMSCl , имидазол (ДМФА), б) $t\text{BuLi}$, ди-трет-бутилдифторсилан (ТДФ), в) HCl (MeOH), г) хлорхромат пиридиния (ДХМ), д) KMnO_4 (ДХМ, трет-бутанол, буфер NaH_2PO_4).

4) Получение rhPSMA-7.1-7.4.

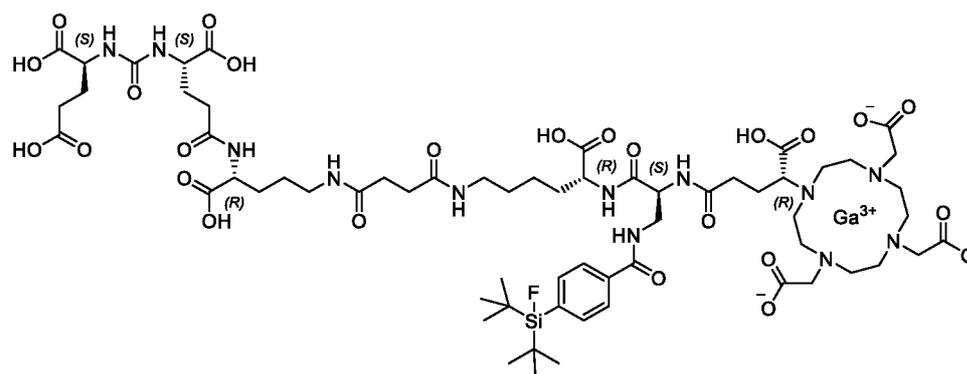
Первые стадии получения четырех различных изомеров rhPSMA-7 идентичны и выполняются вместе с применением стандартного протокола Fmoc-SPPS, описанного выше, начиная с Fmoc-D-Orn(Dde)-OH, связанного со смолой. После отщепления группы Fmoc 20% пиперидином в ДМФА (GP3), проводили конъюгацию $(t\text{BuO})\text{EuE}(\text{OtBu})_2$ (2,0 экв.) с HOAt (2,0 экв.), TBTU (2,0 экв.) и DIPEA (6,0 экв.) в ДМФА в течение 4,5 ч. После отщепления Dde-группы с помощью смеси 2% гидразина в ДМФА (GP4a), добавляли раствор янтарного ангидрида (7,0 экв.) и DIPEA (7,0 экв.) в ДМФА и оставляли для реакции на 2,5 часа. Конъюгирования Fmoc-D-Lys(OtBu)·HCl (2,0 экв.) достигали добавлением к смоле смеси HOAt (2,0 экв.), TBTU (2,0 экв.) и DIPEA (6,0 экв.) в ДМФА. После предварительной активации в течение 5 минут добавляли Fmoc-D-Lys(OtBu)·HCl (2,0 экв.), растворенный в ДМФА, и оставляли для реакции на 2,5 часа (GP2). Последующее отщепление Fmoc-группы проводили путем добавления смеси 20% пиперидина в ДМФА (GP3). Наконец, смолу отщепляли для получения rhPSMA-7.1-7.4 (схема 3).

rhPSMA-7.1 (D-Dap-(R)-DOTA-GA):



Фмос-D-Dap(Dde)-ОН (2,0 экв.) предварительно активировали в смеси HOAt (2,0 экв.), TBTU (2,0 экв.) и 2,4,6-триметилпиридина (6,7 экв.) в ДМФ и добавляли к связанному со смолой пептиду на 2,5 часа. Последующее снятие защиты ортогональной Dde проводили с применением имидазола и гидрохлорида гидроксиламина, растворенных в смеси *n*-метил-2-пирролидона и ДМФА в течение 3 часов. SiFA-BA (1,5 экв.) подвергали реакции со свободным амином боковой цепи с HOAt (1,5 экв.), TBTU (1,5 экв.) и DIPEA (4,5 экв.) в качестве реагентов активации в ДМФА в течение 2 часов. После снятия защиты Фмос пиперидином (GP3), проводили конъюгацию (R)-DOTA-GA(tBu)₄ (2,0 экв.) с HOAT (2,0 экв.), TBTU (2,0 экв.) и 2,4,6-триметилпиридином (6,7 экв.) в ДМФА в течение 2,5 часов. Отщепление от смолы с одновременным снятием защиты кислотонеустойчивых защитных групп проводили в ТФУ согласно GP5. ^{nat}Ga-комплексообразование пептида проводили, как описано в GP6.

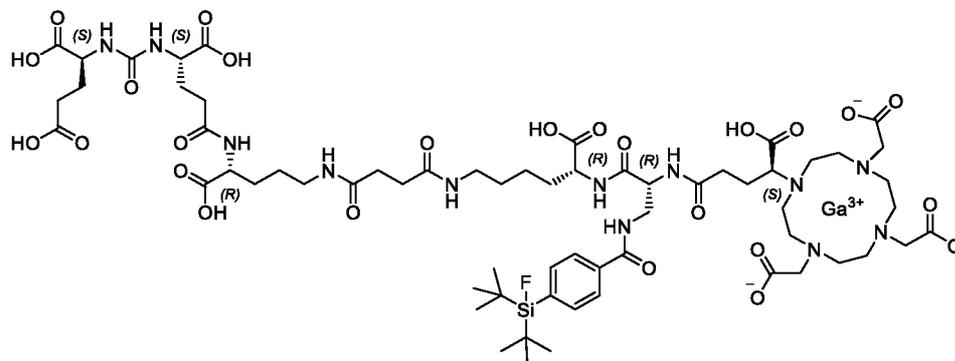
rhPSMA-7.2 (L-Dap-(R)-DOTA-GA):



Фмос-L-Dap(Dde)-ОН (2,0 экв.) предварительно активировали в смеси HOAt (2,0 экв.), TBTU (2,0 экв.) и 2,4,6-триметилпиридина (6,7 экв.) в ДМФА в течение 2,5 ч. После снятия защиты ортогональной Dde, проводили конъюгацию SiFA-BA и отщепление Фмос, как описано для rhPSMA-7.1. Проводили конъюгацию (R)-DOTA-GA(tBu)₄ (2,0 экв.) с HOAT (2,0 экв.), TBTU (2,0 экв.) и 2,4,6-триметилпиридином (6,7 экв.) в ДМФ в течение 2,5 часов. Отщепление от смолы с одновременным снятием защиты кислотонеустойчивых

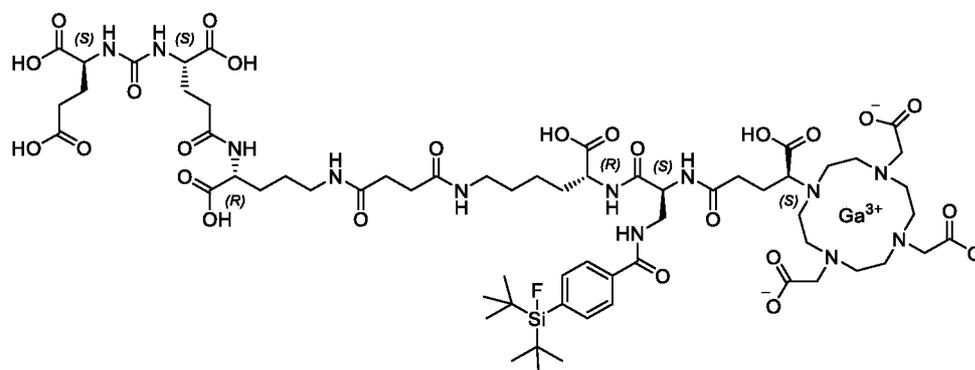
защитных групп проводили в ТФУ согласно GP5. ^{nat}Ga -комплексобразование пептида проводили, как описано в GP6.

rhPSMA-7.3 (D-Dap-(S)-DOTA-GA):



Fmoc-D-Dap(Dde)-OH (2,0 экв.) предварительно активировали в смеси HOAt (2,0 экв.), TBTU (2,0 экв.) и 2,4,6-триметилпиридина (6,7 экв.) в ДМФА в течение 2,5 ч. После снятия защиты ортогональной Dde проводили конъюгацию SiFA-BA и отщепление Fmoc, как описано для rhPSMA-7.1. Проводили конъюгацию (S)-DOTA-GA(tBu)₄ (2,0 экв.) с HOAT (2,0 экв.), TBTU (2,0 экв.) и 2,4,6-триметилпиридином (6,7 экв.) в ДМФА в течение 2,5 часов. Отщепление от смолы с одновременным снятием защиты кислотонеустойчивых защитных групп проводили в ТФУ согласно GP5. ^{nat}Ga -комплексобразование пептида проводили, как описано в GP6.

rhPSMA-7.4 (L-Dap-(S)-DOTA-GA):



Fmoc-L-Dap(Dde)-OH (2,0 экв.) предварительно активировали в смеси HOAt (2,0 экв.), TBTU (2,0 экв.) и 2,4,6-триметилпиридина (6,7 экв.) в ДМФА в течение 2,5 ч. После снятия защиты ортогональной Dde проводили конъюгацию SiFA-BA и отщепление Fmoc, как описано для rhPSMA-7.1. Проводили конъюгацию (S)-DOTA-GA(tBu)₄ (2,0 экв.) с HOAT (2,0 экв.), TBTU (2,0 экв.) и 2,4,6-триметилпиридином (6,7 экв.) в ДМФА в течение 2,5 часов. Отщепление от смолы с одновременным снятием защиты кислотонеустойчивых защитных групп проводили в ТФУ согласно GP5. ^{nat}Ga -комплексобразование пептида проводили, как описано в GP6.

rhPSMA-7.1:

ВЭЖХ (от 10 до 70% В за 15 мин): $t_R = 10,5$ мин.

ВЭЖХ (от 25 до 35% В за 40 мин): $t_R = 31,4$ мин.

rhPSMA-7.2:

ВЭЖХ (от 10 до 70% В за 15 мин): $t_R = 10,4$ мин.

ВЭЖХ (от 25 до 35% В за 40 мин): $t_R = 27,9$ мин.

rhPSMA-7.3:

ВЭЖХ (от 10 до 70% В за 15 мин): $t_R = 10,4$ мин.

ВЭЖХ (от 25 до 35% В за 40 мин): $t_R = 28,1$ мин.

rhPSMA-7.4:

ВЭЖХ (от 10 до 70% В за 15 мин): $t_R = 10,5$ мин.

ВЭЖХ (от 25 до 35% В за 40 мин): $t_R = 29,1$ мин.

rhPSMA-7.1-7.4:

Расчетная моноизотопная масса ($C_{63}H_{96}FGaN_{12}O_{25}Si$): 1536,6, найдено: $m/z = 1539,4 [M+H]^+$, 770,3 $[M+2H]^{2+}$.

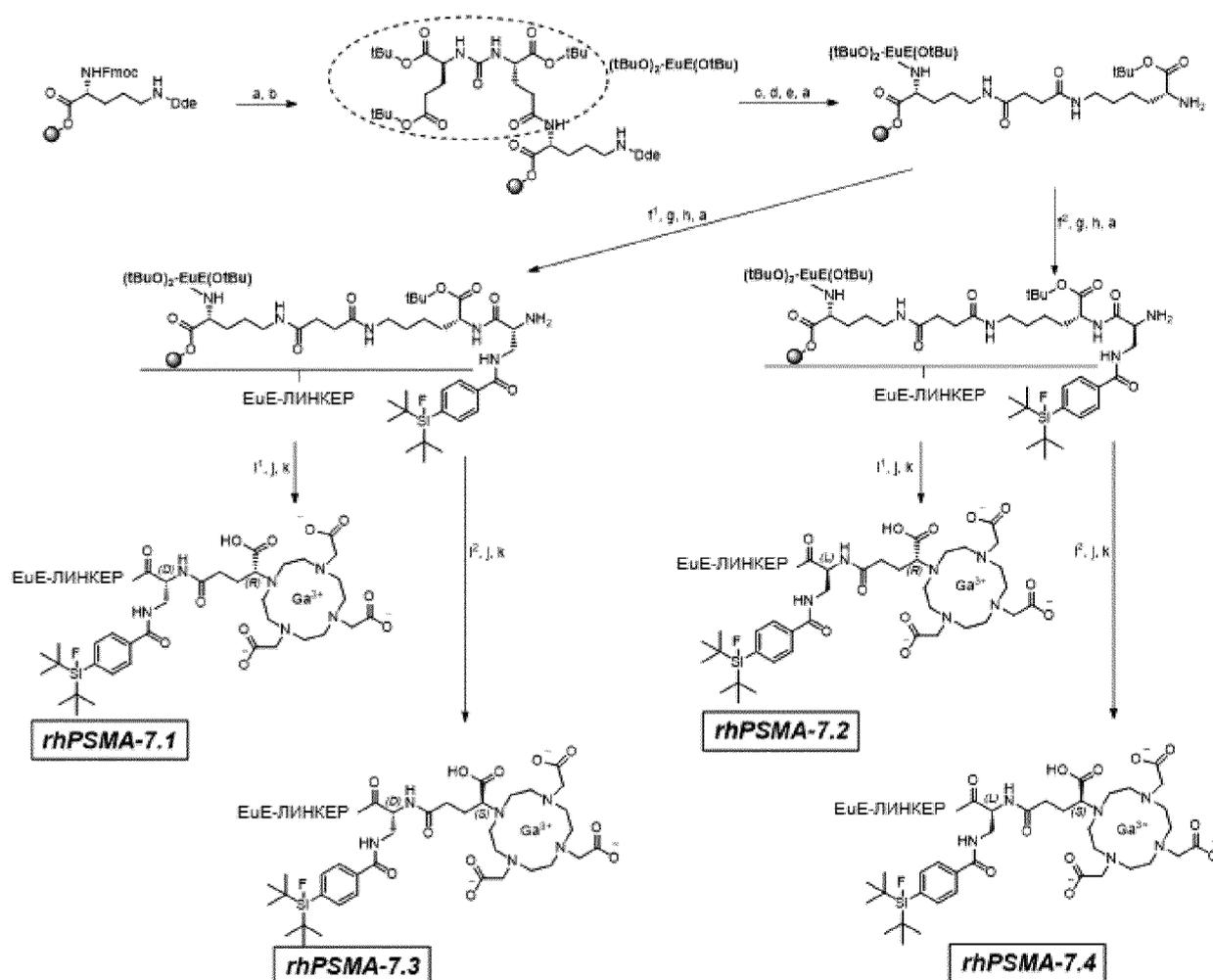


Схема 3. Получение rhPSMA-7.1-7.4: а) 20% пиперидин (ДМФА), б) $(tBuO)EuE(OtBu)_2$, HOAt, TBTU, DIPEA, (ДМФА), в) 2% гидразина (ДМФА), г) янтарный ангидрид, DIPEA (ДМФА), д) Fmoc-D-Lys(OtBu)·HCl, HOAt, TBTU, DIPEA, (ДМФА), e) f^1

Fmoc-D-Dap(Dde)-OH, HOAt, TBTU, 2,4,6-коллиндин, (DMФА), f²) Fmoc-L-Dap(Dde)-OH, HOAt, TBTU, 2,4,6-коллиндин, (DMФА), g) имидазол, гидрохлорид гидроксиламина (н-метил-2-пирролидон, DMФА), h) SiFA-BA, HOAt, TBTU, DIPEA (DMФА), i¹) (R)-DOTA-GA(tBu)₄, HOAt, TBTU, 2,4,6-коллиндин (DMФА), i²) (S)-DOTA-GA(tBu)₄, HOAt, TBTU, 2,4,6-коллиндин (DMФА), j) отщепление и снятие защиты: TФУ, TIPS, H₂O, k) Ga(NO₃)₃, (tBuOH, H₂O).

5) ¹⁸F-мечение

Для мечения ¹⁸F применяли ранее описанный способ (Wangler, C.; Niedermoser, S.; Chin, J.; Orchowski, K.; Schirmacher, E.; Jurkschat, K.; Iovkova-Berends, L.; Kostikov, A. P.; Schirmacher, R.; Wangler, B., One-step (18)F-labeling of peptides for positron emission tomography imaging using the SiFA methodology. Nat Protoc 2012, 7 (11), 1946-55), который немного изменили. Кратко, водный ¹⁸F⁻ пропускали через картридж SAX (Sep-Pak Accell Plus QMA Carbonate light), который предварительно обрабатывали 10 мл воды. После сушки 10 мл воздуха воду удаляли, промывая картридж 10 мл безводного ацетонитрила, а затем 20 мл воздуха. ¹⁸F элюировали 100 мкмоль [K⁺c2.2.2]OH⁻, растворенного в 500 мкл безводного ацетонитрила. Перед мечением добавляли 30 мкмоль щавелевой кислоты в безводном ацетонитриле (1 моль/л, 30 мкл). Эту смесь применяли целиком или ее аликвоту для фторирования от 10 до 25 нмоль PSMA-SiFA (1 ммоль/л в безводном DMCO). Полученную реакционную смесь инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Для очистки меченного вещества применяли световой картридж Sep-Pak C18, предварительно обработанный 10 мл EtOH, а затем 10 мл H₂O. Меченную смесь разбавляли 9 мл PBS (pH 3) и пропускали через картридж, а затем 10 мл H₂O. Пептид элюировали 500 мкл смеси 4:1 (об./об.) EtOH в воде. Радиохимическую чистоту меченого соединения определяли радио- ОФ-ВЭЖХ и радио-ТСХ (силикагель 60 RP-18 F_{254s}, подвижная фаза: смесь 3:2 (об./об.) MeCN в H₂O с добавлением 10% 2 моль/л водного раствора NaOAc и 1% TФУ).

6) ¹²⁵I-мечение

Эталонный лиганд для исследований in vitro ([¹²⁵I]I-BA)CuE получали в соответствии с ранее описанным способом (Weineisen, M.; Simecek, J.; Schottelius, M.; Schwaiger, M.; Wester, H. J., Synthesis and preclinical evaluation of DOTAGA-conjugated PSMA ligands for functional imaging and endoradiotherapy of prostate cancer. EJNMMI research 2014, 4 (1), 63). Кратко, 0,1 мг стanniлированного предшественника (SnBu₃-BA)(OtBu)CuE(OtBu)₂ растворяли в растворе, содержащем 20 мкл перуксусной кислоты, 5,0 мкл (21 МБк) [¹²⁵I]NaI (74 ТБк/ммоль, 3,1 ГБк/мл, 40 ммоль/л NaOH, Hartmann Analytic, Брауншвейг, Германия), 20 мкл MeCN и 10 мкл уксусной кислоты. Реакционный

раствор инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, загружали в картридж и промывали 10 мл воды (картридж C18 Sep Pak Plus, предварительно обработанный 10 мл MeOH и 10 мл воды). После элюирования 2,0 мл смеси 1:1 (об./об.) EtOH/MeCN радиоактивный раствор упаривали досуха в слабом потоке азота и обрабатывали 200 мкл ТФУ в течение 30 мин с последующим выпариванием ТФУ. Неочищенный продукт ($[^{125}\text{I}]\text{I-BA}$)KuE очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ (от 20% до 40% В за 20 мин): $t_R = 13,0$ мин.

Эксперименты *in vitro*

1) Определение IC_{50}

PSMA-позитивные клетки LNCaP выращивали в модифицированной по Дульбекко среде Игла/питательной смеси F-12 с глутамаксом-I (1:1) (Invitrogen), с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки и при поддержании температуры 37 °C в увлажненной атмосфере при 5% CO_2 . Для определения аффинности PSMA (IC_{50}) клетки собирали за 24 ± 2 часа до эксперимента и высевали в 24-луночные планшеты ($1,5 \times 10^5$ клеток в 1 мл/лунку). После удаления культуральной среды клетки обрабатывали один раз 500 мкл HBSS (сбалансированный солевой раствор Хэнка, Biochrom, Берлин, Германия, с добавлением 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА)) и оставляли на 15 минут на льду для уравнивания в 200 мкл HBSS (1% БСА). Затем добавляли 25 мкл на лунку растворов, содержащих либо HBSS (1% БСА, контроль), либо соответствующий лиганд в возрастающей концентрации (от 10^{-10} до 10^{-4} моль/л в HBSS, с последующим добавлением 25 мкл ($[^{125}\text{I}]\text{I-BA}$)KuE (2,0 нмоль/л) в HBSS (1% БСА). Все эксперименты проводили не менее трех раз для каждой концентрации. После 60 мин инкубации на льду эксперимент завершали удалением среды и последовательным промыванием 200 мкл HBSS. Среда обеих стадий объединяли в одну фракцию и представляли количество свободного радиолиганда. После этого клетки лизировали 250 мкл 1 моль/л NaOH и объединяли с 200 мкл HBSS на следующей стадии промывки. Количественное выражение связанного и свободного радиолиганда регистрировали с помощью γ -счетчика.

2) Интернализация

Для исследований интернализации клетки LNCaP собирали за 24 ± 2 часа до эксперимента и высевали в 24-луночные планшеты ($1,25 \times 10^5$ клеток в 1 мл/лунку). После удаления культуральной среды клетки промывали один раз 500 мкл DMEM-F12 (5% БСА) и оставляли для уравнивания не менее 15 мин при 37 °C в 200 мкл DMEM-F12 (5% БСА). Каждую лунку обрабатывали либо 25 мкл DMEM-F12 (5% БСА), либо 100 мкМ раствора РМРА для блокады. Затем добавляли 25 мкл меченого $^{68}\text{Ga}/^{18}\text{F}$ ингибитора PSMA (5,0 нмоль/л) и клетки инкубировали при 37 °C в течение 60 мин. Эксперимент

заканчивали, помещая 24-луночный планшет на лед на 3 мин и последовательно удаляя среду. Каждую лунку промывали 250 мкл HBSS и фракции из этих первых двух стадий объединяли, представляя количество свободного радиолиганда. Удаление поверхностно связанного активного вещества осуществляли путем инкубации клеток с 250 мкл ледяного раствора РМРА (10 мкмоль в PBS) в течение 5 минут и снова промывали еще 250 мкл ледяного PBS. Интернализированное активное вещество определяли путем инкубации клеток в 250 мкл 1 моль/л NaOH и комбинации с фракцией последующей стадии промывки с 250 мкл 1,0 моль/л NaOH. Каждый эксперимент (контрольный и блокировку) проводили в трех повторах. Свободное, поверхностно-связанное и интернализированное активное вещество количественно определяли с помощью γ -счетчика. Все исследования интернализации сопровождали эталонными исследованиями с применением ($[^{125}\text{I}]\text{-VA}$)KuE ($c = 0,2$ нмоль/л), которые выполняли аналогично. Данные скорректировали на неспецифическую интернализацию и нормализовали к специфической интернализации, наблюдаемой для эталонного соединения, меченного радиоактивным йодом.

3) Коэффициент разделения октанол-вода

Приблизительно 1 МБк меченого вещества растворяли в 1 мл смеси 1:1 (по объемам) фосфатно-солевого буфера (PBS, pH 7,4) и н-октанола в пробирке Эппендорфа. После энергичного перемешивания суспензии в течение 3 минут при комнатной температуре пробирку центрифугировали при 15000 g в течение 3 минут (Biofuge 15, Heraeus Sepatech, Остероде, Германия) и проводили измерения для аликвот по 100 мкл обоих слоев на гамма-счетчике. Эксперимент повторяли не менее шести раз.

4) связывание HSA

Для определения связывания HSA применяли колонку Chiralpak HSA (50 \times 3 мм, 5 мкм, H13H-2433) при постоянной скорости потока 0,5 мл/мин. Подвижную фазу (А: NH_4OAc , 50 ммоль/л в воде, pH 7 и В: изопропанол) для каждого эксперимента готовили заново и применяли только в течение одного дня. Колонку хранили при комнатной температуре, и каждый цикл останавливали после обнаружения сигнала, чтобы сократить время сбора данных. Все вещества растворяли в концентрации 0,5 мг/мл в 50% 2-пропаноле и 50% 50 ммоль/л буфере ацетата аммония, значение pH 6,9. Выбранные эталонные вещества демонстрируют диапазон связывания HSA от 13% до 99%, поскольку предполагалось большое разнообразие связывания альбумина в отношении пептидов. Все девять эталонных веществ вводили последовательно, чтобы установить нелинейную регрессию с OriginPro 2016G.

Таблица 1: Эталонные вещества (Yamazaki, K.; Kanaoka, M., Computational prediction of the plasma protein-binding percent of diverse pharmaceutical compounds. Journal of pharmaceutical sciences 2004, 93 (6), 1480-94), применяемые для калибровки колонки HSA.

Эталонное вещество	t_R	Log t_R	Лит., HSA%	Log K HSA
п-бензиловый спирт	2,40	0,38	13,15	-0,82
Анилин	2,72	0,43	14,06	-0,79
Фенол	3,28	0,52	20,69	-0,59
Бензойная кислота	4,08	0,61	34,27	-0,29
Карбамазепин	4,15	0,62	75,00	0,46
п-нитрофенол	5,62	0,75	77,65	0,52
Эстрадиол	8,15	0,91	94,81	1,19
Пробенецид	8,84	0,95	95,00	1,20
Глибенкламид	29,18	1,47	99,00	1,69

Время удерживания показано в качестве примера для проведенного эксперимента, t_R время удерживания, Лит. HSA значение связывания человеческого сывороточного альбумина в [%] по данным литературы, Log K HSA логарифмическое значение K связывания человеческого сывороточного альбумина.

Эксперименты *in vivo*

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с общими правилами защиты животных в Германии и руководящими принципами, принятыми в учреждении, по уходу и применению животных. Для создания ксенотрансплантатов опухоли клетки LNCaP (10^7 клеток/200 мкл) суспендировали в смеси 1:1 (об./об.) модифицированной по Дульбекко среды Игла/питательной смеси F-12 с глутамаксом-I (1:1) и матригелем (BD Biosciences, Германия) и подкожно вводили в правое плечо мышей CB17-SCID в возрасте от 6 до 8 недель (Charles River, Зульцфельд, Германия). Мышей использовали, когда опухоли достигали диаметра от 5 до 8 мм (от 3 до 4 недель после инокуляции).

1) Биораспределение

Приблизительно от 1 до 2 МБк (менее 0,2 нмоль) ^{18}F -меченного ингибитора PSMA вводили в хвостовую вену самцов мышей CB-17 SCID, несущих опухоль LNCaP, и умерщвляли через 1 час после инъекции (n = от 4 до 5). Выбранные органы удаляли, взвешивали и измеряли на γ -счетчике.

2) Исследования метаболизма

а) Аналитическая установка

Аналитическую обращенно-фазовую хроматографию высокого давления (ОФ-ВЭЖХ) выполняли с применением градиентных систем Shimadzu (Shimadzu Deutschland GmbH, Нойфарн, Германия), оснащенных детектором в ультрафиолетовой и видимой области спектра SPD-20A (220 нм, 254 нм). Колонку Multospher 100 RP18 (125 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм) (CS GmbH, Лангервез, Германия) применяли для аналитических измерений при скорости потока 1 мл/мин. В качестве элюентов для всех операций ВЭЖХ применяли воду (растворитель А) и ацетонитрил (растворитель В), оба содержали 0,1% трифторуксусной кислоты. Радиоактивность регистрировали путем подключения выхода УФ-фотометра к детектору HERM LB 500 (Berthold Technologies GmbH, Бад-Вильдбад, Германия). Градиент для всех операций ВЭЖХ составлял: 5% изократический от 0 до 3 мин, от 25 до 35% В от 3 до 43 мин, от 95 до 95% В от 43 до 48 мин.

Для радиотонкослойной хроматографии применяли алюминиевые листы, покрытые силикагелем 60 RP-18 F_{254s} с подвижной фазой, состоящей из смеси 3:2 (об./об.) MeCN в H₂O с добавлением 10% 2 моль/л водного NaOAc и 1% ТФУ. Анализ выполняли с применением радио-ТСХ-детектора Scan-RAM (LabLogic Systems Ltd., Шеффилд, Великобритания) или установки для формирования изображения на люминесцентном фосфорном покрытии CR 35 BIO (Duerr Medical GmbH, Битигхайм-Биссинген, Германия).

б) Определение метаболической стабильности rhPSMA-7.1-7.4.

Для исследований микрометаболизма *in vivo* в хвостовую вену самок здоровых мышей CB17-SCID (n = 4) вводили от 8 до 12 МБк (менее 0,6 нмоль) соответствующего ¹⁸F-меченного лиганда (rhPSMA-7.1-7.4). Мышей оставляли под анестезией на 30 мин и собирали мочу с помощью катетера мочевого пузыря. Образцы мочи объединяли и центрифугировали в течение 5 минут при 9000 об/мин для удаления взвешенных твердых частиц. Супернатант непосредственно применяли для анализа радио-ВЭЖХ в вышеупомянутых условиях. Чтобы продемонстрировать, что в моче происходит изотопный обмен ¹⁹F на связанный с пептидом ¹⁸F, каждое соединение инкубировали в течение определенных интервалов времени с образцами мочи здоровых самок мышей CB-17-SCID, которые анализировали с помощью радио-ВЭЖХ и/или радио-ТСХ. Кроме того, указанный эксперимент проводили с добавлением избытка Na¹⁹F (0,5 мкмоль) и инкубацией в течение 2 ч с меченым ¹⁸F rhPSMA-7.3.

с) Определение распределения rhPSMA-7.1-7.4 *in vivo*.

Для количественной оценки относительного накопления каждого изомера (rhPSMA-7.1-7.4) самцу мыши, несущему опухоль CB-17-SCID вводили рацемическую смесь rhPSMA-7 (от 180 до 280 МБк, S_A = от 247 до 349 ГБк/мкмоль, произведено в Klinikum rechts der Isar полностью автоматизированным способом). Животное оставляли

под анестезией на 30 мин и умерщвляли. Мочу, кровь, печень, почки и опухоль собирали и обрабатывали в соответствии с описанными ниже способами. Образец мочи центрифугировали в течение 5 минут при 9000 об./мин, чтобы получить прозрачный раствор, и непосредственно подвергали анализу с помощью радио-ВЭЖХ. Кровь разбавляли до 1 мл H₂O и дважды центрифугировали при 13000 g в течение 5 мин. Супернатант собирали и загружали в картридж Strata X (33 мкм полимерная обращенная фаза, 500 мг, предварительно обрабатывали 5 мл MeOH, а затем 5 мл H₂O). После промывания 5 мл H₂O картридж элюировали смесью 6:4 (об./об.) MeCN в H₂O с добавлением 1% ТФУ. Элюат разбавляли водой и анализировали радио-ВЭЖХ. Опухоль, почки и печень гомогенизировали с применением гомогенизатора тканей Potter-Elvehjem (Kontes Glass Co, Вайнленд, США) или шаровой мельницы MM-400 (Retsch GmbH, Хаан, Германия).

I) Гомогенизатор тканей Potter-Elvehjem

Опухоль и почки отдельно гомогенизировали в гомогенизаторе тканей с 1 мл буфера для экстракции (850 мкл 1 моль/л HEPES pH 7,4, 100 мкл 20 ммоль/л PMPA и 100 мкл 1 моль/л NaCl) в течение 30 мин. Полученный гомогенат собирали и центрифугировали при 13000 g в течение 5 мин. Впоследствии супернатант собирали, снова центрифугировали (13000 g, 5 мин) и загружали в картридж Strata X (полимерная обращенная фаза 33 мкм, 500 мг, предварительно обрабатывали 5 мл MeOH, а затем 5 мл H₂O). После промывания 5 мл H₂O картридж элюировали смесью 6:4 (об./об.) MeCN в H₂O с добавлением 1% ТФУ. Элюат каждого органа разбавляли водой и анализировали радио-ВЭЖХ.

II) Шаровая мельница MM-400

Органы (опухоль, почка, печень) отдельно гомогенизировали в пробирке объемом 2 мл вместе с 3 мелющими шарами (диаметром 3 мм) и 1 мл буфера для экстракции (850 мкл 1 моль/л HEPES pH 7,4, 100 мкл 20 ммоль/л PMPA и 100 мкл 1 моль/л NaCl) в течение 10 мин при 30 Гц. Гомогенат центрифугировали при 13000 g в течение 5 мин и собирали супернатант. Затем осадок суспендировали в 1 мл буфера для экстракции и снова гомогенизировали с помощью шаровой мельницы в течение 10 минут при 30 Гц. После центрифугирования (13000 g, 5 мин) оба супернатанта объединяли и загружали в картридж Strata X (33 мкм полимерная обращенная фаза, 500 мг, предварительно обрабатывали 5 мл MeOH, а затем 5 мл H₂O). После промывания 5 мл H₂O картридж элюировали смесью 6:4 (об./об.) MeCN в H₂O с добавлением 1% ТФУ. Элюат каждого органа разбавляли водой и анализировали с помощью радио-ВЭЖХ. Чтобы продемонстрировать, что прорыв во время загрузки картриджа не является результатом

несвязанного F-18, супернатант также исследовали с помощью радио-ТСХ после центрифугирования.

Наконец, соотношения индивидуальных изомеров определяли из профилей ВЭЖХ экстрагированных образцов и сравнивали с соотношениями изомеров из контроля качества рацемической смеси rhPSMA-7. Эффективность экстракции с поправкой на распад и загрузки картриджа, а также общая экстракционная активность исследованных образцов приведены в таблице 2. Эффективность элюирования картриджа составляла более 99% для всех экспериментов.

Пример 2: Результаты

Отнесение хроматографических пиков

Отнесение хроматографических пиков проводили путем сравнения УФ-профилей

a) рацемическая смесь rhPSMA7-рас

b) рацемическая смесь rhPSMA7-рас, совместно инъецированная с каждым энантимерно чистым соединением rhPSMA7.

Для различных изомеров применяли следующие названия:

rhPSMA-рас: [^{19}F] [$^{\text{nat}}\text{Ga}$]D/L-Dap-R/S-DOTAGA-rhPSMA7

rhPSMA-7-1: [^{19}F] [$^{\text{nat}}\text{Ga}$]D-Dap-R-DOTAGA-rhPSMA7

rhPSMA-7-2: [^{19}F] [$^{\text{nat}}\text{Ga}$]L-Dap-R-DOTAGA-rhPSMA7

rhPSMA-7-3: [^{19}F] [$^{\text{nat}}\text{Ga}$]D-Dap-S-DOTAGA-rhPSMA7

rhPSMA-7-4: [^{19}F] [$^{\text{nat}}\text{Ga}$]L-Dap-S-DOTAGA-rhPSMA7.

Таблица 2: Отнесение различных изомеров, названий, типичных значений времени удерживания (условия ВЭЖХ приведены на фиг. 2a-4b, и процентное содержание каждого изомера в типичной смеси rhPSAM7-рас. Точное количество может варьироваться для каждого изомера.

Лиганд	Название	t_R [мин]	типичный процент от всей смеси
[^{19}F][$^{\text{nat}}\text{Ga}$]D-Dap-R-DOTAGA-rhPSMA7	rhPSMA-7-1	31,6	21
[^{19}F][$^{\text{nat}}\text{Ga}$]L-Dap-R-DOTAGA-rhPSMA7	rhPSMA-7-2	28,3	22
[^{19}F][$^{\text{nat}}\text{Ga}$]D-Dap-S-DOTAGA-rhPSMA7	rhPSMA-7-3	28,9	37
[^{19}F][$^{\text{nat}}\text{Ga}$]L-Dap-S-DOTAGA-rhPSMA7	rhPSMA-7-4	30,1	20

Аффинность связывания

Первый набор значений (rhPSMA-7.1 и rhPSMA-7.2, фиг. 6a) определяли с применением для серии разведений раствора, непосредственно полученного после $^{\text{nat}}\text{Ga}$ -

комплексообразования соответствующего лиганда. Во втором наборе данных (фиг. 6b) комплексные лиганды очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ для отделения солей ^{nat}Ga , не входящих в комплекс. Поскольку значимых различий не обнаружили, обе серии объединили и применяли для расчета средних значений (\pm стандартное отклонение).

Таблица 3: Изображение отдельных измерений IC₅₀ [нмоль/л] (как показано на фиг. 6a и 6b). Условия приведены в описании к фиг. 6a.

Номер	rhPSMA7.1	rhPSMA7.2	rhPSMA7.3	rhPSMA7.4
1	8,74	3,17	nd	nd
2	6,91	2,97	nd	nd
3	7,27	3,36	nd	nd
4	5,04	2,64	3,17	3,4
5	1,21 (*)	2,76	2,91	3,56
6	7,11	3,94	5,35	2,79
7	8,31	5,8	5,74	4,57
8	4,97	4,31	4,59	3,78
9	6,44	4,32	4,45	nd
Среднее значение	6,85	3,70	4,37	3,62
Стандартное отклонение	1,36	1,01	1,14	0,65

* Значение номер 5 серии rhPSMA7.1 было удалено (статистический выброс).

Таблица 4: Аффинность связывания (IC₅₀ [нмоль/л]) других выбранных ингибиторов PSMA (*).

Номер	Ингибитор	IC ₅₀ [нмоль/л]
1	(I-BA)KuE	7,1 \pm 2,4 нМ
2	DCFPyL	12,3 \pm 1,2 нмоль/л
3	DKFZ1007	4,2 \pm 0,5 нмоль/л

* проведено в лаборатории авторов изобретения с применением идентичного анализа связывания. (Robu et al. EJNMMI Research 2018; 8:30).

Исследования интернализации

Таблица 5: Индивидуальные уровни интернализации [% от [^{125}I]IB-KuE].

	rhPSMA7.1	rhPSMA7.2	rhPSMA7.3	rhPSMA7.4
1	61,8	188,7	156,6	209,6
1	70,6	182,7	156,0	202,6
1	68,0	169,5	171,7	209,8
1	67,9	205,3	-	-
1	71,5	212,6	-	-
1	77,5	192,3	-	-
Среднее значение	69,55	191,83	161,41	207,33
Стандартное отклонение	5,19	15,54	8,88	4,06

Таблица 6: Значения интернализации [% [125 I]IB-KuE] от других выбранных ингибиторов PSMA (*).

Номер	Ингибитор	Интернализация [%]
1	PSMA-1007	118 ± 4
2	DCFPyL	118 ± 5

* проведено в лаборатории авторов изобретения с применением идентичного анализа связывания. (Robu et al. EJNMMI Research 2018; 8:30)

Липофильность (коэффициент распределения октанол-вода)

Определение значений $\log P$ проводили в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7,4) и н-октаноле (= $\log P_{\text{oct/PBS}}$).

Таблица 7: Индивидуальные измерения $\log P$ для изомеров rhPSMA7 от 7.1- до 7.4, определенные в смесях октанол/PBS_{7,4}.

	rhPSMA7.1	rhPSMA7.2	rhPSMA7.3	rhPSMA7.4	rhPSMA7- rac
1	-2,79	-3,00	-3,03	-3,09	-3,23
2	-2,82	-3,01	-3,08	-3,12	-3,15
3	-2,80	-3,00	-3,07	-3,06	-3,17
4	-2,84	-3,00	-3,02	-3,07	-3,10
5	-2,88	-3,03	-3,06	-3,10	-3,17
6	-2,90	-2,96	-3,07	-3,04	-3,24

7	-2,85	-2,94	-3,06	-2,99	-3,80
8	-2,86	-2,89	-2,86	-2,97	-3,60
9	-3,14	-3,02	-3,39	-3,37	-3,87
10	-3,29	-3,02	-3,33	-3,43	-3,61
11	-3,26	-3,06	-3,34	-3,29	-3,76
12	-3,02	-3,02	-3,34	-3,48	-3,65
13	-3,15	-2,99	-3,20	-3,52	-3,67
14	-3,57	-3,02	-3,39	-3,50	-
15	-3,40	-3,06	-3,40	-3,44	-
16	-3,32	-3,14	-3,41	-3,41	-
17	-3,64	-3,40	-3,48	-3,56	-
18	-3,92	-3,50	-3,49	-3,61	-
19	-	-3,45	-3,32	-3,58	-
20	-	-3,45	-3,45	-3,54	-
21	-	-3,53	-3,53	-3,42	-
22	-	-3,48	-3,43	-3,57	-
23	-	-	-3,56	-3,67	-
Среднее значение	-3,14	-3,13	-3,26	-3,33	-3,46
Стандартное отклонение	0,34	0,22	0,19	0,22	0,29

Таблица 8: значения $\log P$ изомеров PSMA-1007, DCFPYL, rhPSMA7-*rac* и rhPSAM-7.1-7.4, ($n = 6$), октанол/PBS_{7.4}.

Ингибитор	$\log P$
PSMA-1007	-1,6
DCFPyL	-3,4
^{nat} Ga- ¹⁸ F-rhPSMA7- <i>rac</i> ,	- 3,46 ± 0,29
⁶⁸ Ga- ^{nat} F-rhPSMA7- <i>rac</i>	
^{nat} Ga- ¹⁸ F-rhPSMA7.1	- 3,14 ± 0,34
^{nat} Ga- ¹⁸ F-rhPSMA7.2	- 3,13 ± 0,22
^{nat} Ga- ¹⁸ F-rhPSMA7.3	- 3,26 ± 0-19

$^{nat}\text{Ga-}^{18}\text{F-rhPSMA7.4}$	$- 3,33 \pm 0,22$
---	-------------------

Связывание ингибиторов PSMA с белком плазмы человека (HSA)

Таблица 9: Связывание с HSA изомеров PSMA-1007, DCFPYL, rhPSMA7-гас и rhPSAM-7.1-7.4, (n = 6). Определено на колонке Chiralpak HSA (50 × 3 мм, 5 мкм, H13H-2433).

Ингибитор	Связывание с HSA [%]
PSMA-1007	97,8
DCFPyL	14,3
$^{68}\text{Ga-}^{nat}\text{F-rhPSMA7-rac}$	96,7
$^{nat}\text{Ga-}^{18}\text{F-rhPSMA7.1}$	97,7
$^{nat}\text{Ga-}^{18}\text{F-rhPSMA7.2}$	97,8
$^{nat}\text{Ga-}^{18}\text{F-rhPSMA.3}$	96,9
$^{nat}\text{Ga-}^{18}\text{F-rhPSMA7.4}$	96,6

Биораспределение [^{18}F][^{nat}Ga]rhPSMA-7.1-7.4 через 1 час после инъекции

Таблица 10: Биораспределение (в % ID/г) $^{18}\text{F-rhPSMA}$ через 1 час после инъекции у мышей SCID, несущих опухоль LNCaP. Данные выражены как среднее значение ± стандартное отклонение (n = 4 для rhPSMA7.1, n = 5 для 7.2, n = 4 для 7.3, n = 5 для 7.4 и n = 3 для 7-гас).

	$^{18}\text{F}[^{nat}\text{Ga}]$ -rhPSMA-7-1	$^{18}\text{F}[^{nat}\text{Ga}]$ -rhPSMA-7-2	$^{18}\text{F}[^{nat}\text{Ga}]$ -rhPSMA-7-3	$^{18}\text{F}[^{nat}\text{Ga}]$ -rhPSMA-7-4	$^{18}\text{F}[^{nat}\text{Ga}]$ -rhPSMA-rac
Кровь	$0,53 \pm 0,13$	$0,56 \pm 0,20$	$0,96 \pm 0,24$	$1,15 \pm 0,30$	$1,1 \pm 0,03$
Сердце	$0,53 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,13$	$0,87 \pm 0,17$	$0,71 \pm 0,26$	$0,69 \pm 0,07$
Легкое	$1,1 \pm 0,21$	$0,89 \pm 0,38$	$2,2 \pm 0,35$	$1,59 \pm 0,61$	$1,4 \pm 0,17$
Печень	$0,75 \pm 0,62$	$0,35 \pm 0,08$	$0,69 \pm 0,13$	$0,69 \pm 0,20$	$0,67 \pm 0,07$
Селезенка	$20,0 \pm 4,2$	$10,1 \pm 6,3$	$16,6 \pm 2,6$	$18,4 \pm 9,77$	$11,1 \pm 2,3$

Поджелудочная железа	0,45 ± 0,12	0,21 ± 0,08	0,63 ± 0,44	0,50 ± 0,30	0,60 ± 0,10
Желудок	0,28 ± 0,17	0,19 ± 0,08	0,44 ± 0,23	0,25 ± 0,06	0,49 ± 0,07
Кишечник	0,30 ± 0,16	0,18 ± 0,07	0,35 ± 0,07	0,37 ± 0,09	0,60 ± 0,27
Почки	220 ± 24,8	87,6 ± 28,8	292 ± 45,1	153 ± 80,3	71,3 ± 13,3
Надпочечники	2,0 ± 0,25	1,3 ± 0,8	2,2 ± 0,83	3,57 ± 2,38	3,0 ± 0,45
Мышца	0,32 ± 0,30	0,13 ± 0,07	0,33 ± 0,15	0,31 ± 0,08	0,36 ± 0,06
Кость	0,50 ± 0,31	0,31 ± 0,24	0,38 ± 0,32	0,62 ± 0,30	0,91 ± 0,11
Опухоль	14,1 ± 4,1	6,5 ± 2,3	18,3 ± 7,2	18,9 ± 3,27	10,4 ± 0,67

Биораспределение [^{18}F][$^{\text{nat}}\text{Ga}$]rhPSMA-7.1-7.4 через 1 час после инъекции с конкуренцией

Таблица 11: Биораспределение [% ID/г] меченых ^{18}F меток rhPSMA, совместно инъектированных с РМРА (8 мг/кг) через 1 час после инъекции у мышей SCID, несущих опухоль LNCaP. Данные выражены как среднее значение ± стандартное отклонение (n = 3).

	[^{18}F][$^{\text{nat}}\text{Ga}$]-rhPSMA-7-1	[^{18}F][$^{\text{nat}}\text{Ga}$]-rhPSMA-7-2	[^{18}F][$^{\text{nat}}\text{Ga}$]-rhPSMA-7-3	[^{18}F][$^{\text{nat}}\text{Ga}$]-rhPSMA-7-4
Кровь	0,86 ± 0,40	1,1 ± 0,31	0,55 ± 0,14	0,82 ± 0,17
Сердце	0,37 ± 0,16	0,47 ± 0,09	0,26 ± 0,04	0,37 ± 0,05
Легкое	0,85 ± 0,29	1,1 ± 0,32	0,69 ± 0,10	0,74 ± 0,14
Печень	0,43 ± 0,07	0,46 ± 0,07	0,46 ± 0,14	0,48 ± 0,14
Селезенка	0,21 ± 0,08	0,26 ± 0,07	0,35 ± 0,02	0,28 ± 0,15
Поджелудочная железа	0,16 ± 0,10	0,12 ± 0,05	0,11 ± 0,02	0,18 ± 0,09
Желудок	0,97 ± 0,81	0,21 ± 0,06	0,76 ± 0,74	0,20 ± 0,07
Кишечник	0,66 ± 0,32	0,33 ± 0,10	0,94 ± 0,97	0,36 ± 0,08
Почки	10,9 ± 2,5	10,9 ± 1,0	15,5 ± 2,2	7,2 ± 2,4
Надпочечники	0,003 ± 0,004	0,07 ± 0,10	0,07 ± 0,09	0,03 ± 0,04
Мышца	0,17 ± 0,15	0,09 ± 0,03	0,09 ± 0,02	0,20 ± 0,05
Кость	0,33 ± 0,24	0,57 ± 0,39	0,34 ± 0,22	1,0 ± 0,8
Опухоль	0,94 ± 0,22	1,0 ± 0,13	1,5 ± 0,4	0,99 ± 0,19

Количественная оценка относительных изменений количества каждого изомера rhPSMA7.x в крови, почках, печени, моче и опухоли после применения [¹⁸F]rhPSMA7-гас

С целью количественной оценки относительных изменений каждого изомера rhPSMA7 в крови, печени, почках, моче и опухоли через 30 минут после инъекции [¹⁸F]rhPSMA7-гас мышам, несущим опухоль LNCaP, применяли два разных способа гомогенизации (гомогенизирующий и шаровая мельница) для извлечения метки из ткани почек, печени и опухоли (см. раздел материалы и способы).

В таблице 12 суммирована наблюдаемая эффективность обоих способов гомогенизации и эффективности последующей процедуры твердофазной экстракции (для отделения метки от белковой фракции).

Таблица 12: Определение экстрагирования активного вещества с поправкой на распад из исследованных образцов ткани с помощью гомогенизатора тканей Potter-Elvehjem (n = 1) и шаровой мельницы MM-400 (n = 3).

Гомогенизатор тканей Potter-Elvehjem (n = 1):			
		Эффективность [%]	
	Экстракция образца	Загрузка картриджа SPE	Всего
Кровь	93	93	86
Почки	91	66	60
Опухоль	90	59	53
Шаровая мельница MM-400 (n = 3):			
		Эффективность [%]	
	Экстракция образца	Загрузка картриджа SPE	Всего
Кровь	98 ± 2	94 ± 2	92 ± 3
Печень	97	89 ± 2	86 ± 2
Почки	63 ± 5	68 ± 8	43 ± 8
Опухоль	64 ± 18	65 ± 3	42 ± 14

В то время как экстракция активного вещества из образцов с помощью гомогенизатора была довольно эффективным, применение шаровой мельницы не

оправдало ожиданий. Тем не менее, даже с шаровой мельницей была достигнута эффективность экстракции более 60%.

Принимая во внимание возможные виды, которые могли образоваться при метаболическом расщеплении амидных связей rhPSMA7, только а) виды со значительно увеличивающейся липофильностью б) F¹⁸-фторида кажутся вероятными. Таким образом, в принципе кажется возможным, что виды "iL", изображенные на фиг. 12, не экстрагируются из образца ткани (водная экстракция) и, следовательно, не появляются в окончательном анализе.

Однако следует отметить, что такие виды могут появляться *in vivo* в печени и кишечнике (гепатобилиарная экскреция липофильных соединений) или должны связываться с белками плазмы (что приводит к высоким уровням активного вещества в крови, которые, с другой стороны, показывают отличную эффективность экстракции).

Для количественного определения каждого изомера в рацемической смеси и особенно для плохо разделенных первого и второго пиков (rhPSMA 7.2 и rhPSMA 7.3) первоначально применяли графическое приближение. Этот способ был основан на предположении, что а) каждый изомер элюируется из колонки для ВЭЖХ с идентичной формой пика и б) разные высоты пиков могут применяться в качестве первого приближения для расчета с помощью линейных факторов за вычетом отдельных пиков (т.е. rhPSMA 7.2 и rhPSMA 7.3).

Основываясь на этих предположениях, первый анализ выполняли с применением мышей, несущих опухоль LNCaP, которым одновременно вводили [¹⁸F][^{nat}Ga]rhPSMA7-gas. С целью подтверждения этих экспериментов с помощью трех дополнительных экспериментов и улучшения графического анализа с помощью более достоверной процедуры применяли программный пакет Systat "PeakFit". PeakFit позволяет автоматизировать нелинейное разделение, анализ и количественную оценку профилей элюирования ВЭЖХ с помощью процедур деконволюции, где применяется функция отклика Гаусса с алгоритмом деконволюции Фурье/фильтрации (<https://systatsoftware.com/products/peakfit/>).

Сравнение графического анализа первых экспериментов показало, что второй пик переоценён в графическом анализе (rhPSMA7.3), тогда как первый пик недооценен. Следовательно, все наборы данных повторно проанализировали и количественно оценили с помощью PeakFit.

ВЭЖХ-анализы 4 независимых экспериментов на мышах, несущих опухоли, 30 мин после инъекции.

1. Оценка пиков 3 и 4 (rhPSMA 7.4 и rhPSMA 7.1) с помощью радио-ВЭЖХ.

Сначала определили, показывает ли способ деконволюции аналогичные данные для двух последних пиков (rhPSMA7.4 и 7.1), которые имеют хорошее разделение (хотя они не разделены по базовой линии).

2. Оценка всех пиков (rhPSMA7.1, 7.2, 7.3 и 7.4) с помощью радио-ВЭЖХ.

На фиг. 14a и 14b суммировано процентное изменение каждого изомера rhPSAM7.n в данном образце по отношению к его процентному содержанию во введенном растворе ($[^{18}\text{F}][^{\text{nat}}\text{Ga}]\text{rhPSMA7-гac}$), результаты для отдельного эксперимента показаны на фиг. 14. Долю каждого изомера определяли количественно путем анализа профиля элюирования ВЭЖХ с помощью Systat "PeakFit". Затем рассчитывали процентное изменение каждого изомера в данном образце по отношению к его процентному содержанию во введенном растворе.

3. Обсуждение данных ВЭЖХ.

Анализ радио-ВЭЖХ радиоактивных веществ, экстрагированных из гомогенизированных (почка, печень, опухоль) или разбавленных (кровь) тканей и впоследствии иммобилизованной на картридже для твердофазной экстракции и элюированной из нее, не показали никаких признаков метаболической нестабильности. Таким образом, липофильных метаболических фрагментов не обнаружено. Следует отметить, что F-18-фторид не может быть точно обнаружен с помощью ВЭЖХ в условиях, применяемых для подготовки образца (см. Анализ ТСХ).

Хотя существует четкая тенденция к применению rhPSMA7.1 и 7.3, производных от D-Dар, общие изменения незначительны (максимум 15%). В этом контексте также важно подчеркнуть, что на фиг. 15 и 16 показаны "относительные изменения" без учета абсолютных значений накопления.

Хотя rhPSMA7.1 имеет самую слабую аффинность и интернализацию среди всех соединений rhPSMA7, оно показывает наибольшее положительное процентное изменение в крови печени, почки и опухоли.

Хотя причина этого результата неясна, можно предположить, что гомогенизация образцов ткани, даже с помощью шаровой мельницы, не привела к количественному разрушению клеток. Таким образом, метки rhPSMA7 с наибольшей интернализацией (rhPSMA7.2: $191,83\% \pm 15,54\%$, rhPSMA7.4: $207,33 \pm 4,06\%$ и rhPSMA7.3: $161,41\% \pm 8,88\%$) могли быть извлечены менее эффективно, тогда как rhPSMA7.1 с его низкой интернализацией, составляющей всего $69,55\% \pm 5,29\%$, был эффективно экстрагирован и, следовательно, его показатели были завышены при анализе ВЭЖХ.

Кроме того, кажется, что соединения rhPSMA 7.2 и 7.4 выводятся быстрее (см. значения для мочи). Эти соединения показывают в целом отрицательные изменения в

твердых тканях и крови, хотя оба соединения демонстрируют более высокую аффинность и скорость интернализации по сравнению с rhPSMA7.1. Может ли это быть вызвано метаболической деградацией 7.2 и 7.4 (оба являются производными L-Dap), неясно, поскольку метаболитов, то есть лиофильных метаболитов, обнаружено не было. Однако возможно, что такие метаболиты (см. фиг. 11) из-за их высокого значения $\log P$ не экстрагируются водными буферными растворами. В этом случае они должны появиться в печени (см. биораспределение) и, возможно, в образцах крови (высокая вероятность высокого связывания с белками сыворотки). Поскольку в ходе исследований биораспределения в ткани печени не наблюдалось повышенного накопления активного вещества, а экстрагирование активного вещества из крови было высокоэффективным (см. таблицу 3), авторами изобретения сделано предположение, что значимого разложения rhPSMA7.2 и 7.4 не произошло. Это предположение подтверждается подозрительными значениями SUV для ткани печени (желчный пузырь, кишечник) в контексте клинического применения [^{18}F]rhPSMA-гас у людей.

ТСХ-анализ у мышей, несущих опухоль 30 мин после инъекции

Анализ радио-ТСХ проводили: а) на образцах мочи путем прямого нанесения небольшого объема на полоску для ТСХ, б) путем анализа небольшого объема неиммобилизованного активного вещества во время процесса SPE ("фракция прорыва") и с) анализом небольшого объема элюатов картриджа.

Таблица 13: Анализ крови, органов и мочи способом ТСХ

Дата	Образец	Сканера ТСХ		Установка для формирования изображения на люминесцентном фосфорном покрытии		Комментарий*
		Интактная метка [%]	^{18}F -фторид [%]	Интактная метка [%]	^{18}F -фторид [%]	
30.07.2018	КК					Интенсивность сигнала ТСХ [имп] (в целом низкий-низкий)
	Кровь	85,96	14,04	Методологические проблемы		57
	Печень	80,99	19,01			142
	Почки	94,04	5,96			369

	Моча	82,51	17,49			726
	Опухоль	94,19	5,81			172
01.08.2 018	КК	94,27	5,73	96,02	3,98	384
	Кровь	90,24	9,76			41
	Печень	92,49	7,51	93,92 [#]	6,08 [#]	173
	Почки	94,58	5,42			572
	Моча	96,2	3,80	98,55	1,55	395
	Опухоль	90,53	9,47			190
02.08.2 016	КК	Уровень активного вещества слишком низкий для ТСХ		97,43	2,57	
	Кровь			96,80	3,20	
	Печень			74,15 [#]	25,85 [#]	
	Почки			96,48	3,52	
	Моча			95,85	4,15	
	Опухоль			96,47	4,15	
(*) вследствие низкого уровня активного вещества измерения ТСХ с интенсивностью сигнала менее 200 имп были удалены.						

Обсуждение данных ТСХ

Поскольку очень сложно обнаружить п.с.а. ^{18}F -фторид с помощью колонки для хроматографии RP-18 (из-за свободных групп Si-OH матрицы, которые взаимодействуют с пса фторидом), проводили тонкослойную хроматографию для количественного определения F-18-фторида в экстрагированных растворах.

Поскольку ни один из реагентов и солей, обычно применяемых для осаждения белков, не тестируется на холодный фторид, и во избежание возможного высвобождения фторида F-18 от метки путем изотопного обмена, осаждение белка не применяли в процессе подготовки образца, хотя такая белковая нагрузка часто приводит к ограниченному разделению пиков, отставанию пиков и активности, которая остается на линии старта. Растворы, полученные после экстракции тканей (или центрифугирования крови), непосредственно применяли для анализа ТСХ.

Хотя активного вещества, доступного для анализа, было довольно мало во всех образцах, результаты ТСХ показывают, что общее содержание F-18-фторида было ниже приблизительно 6% в исследуемой ткани, за исключением:

- образца мочи от 30 июля 2018 г. (17,49% свободного фторида),
- образца печени, полученный 2 августа 2018 г. (25,85% свободного фторида).

В то время как анализ мочи, полученный с помощью ТСХ считается достоверным результатом (см. Профиль на фиг. 20), результат, полученный на образце печени, вызван значительным отставанием пика, представляющего интактную метку (см. фиг. 18). Кроме того, можно сделать вывод, что вышеупомянутый максимальные 6% свободного фторида представляют собой завышенную оценку, поскольку хвостовая часть пика, даже полученная во время КК и высвобождение [F-18]rhPSMA7-rac в PBS (фиг. 18) для клинического применения, показывает хвостовую часть пика продукта. Как демонстрируют изображения на люминесцентном фосфорном покрытии, этот хвост наблюдается почти при каждом анализе ТСХ и вносит вклад в интегрированную площадь F-18-фторида.

Следует отметить, что ни исследования биораспределения, ни клинические ПЭТ-сканирование у людей (по состоянию на июль 2018 г.: приблизительно 1400 сканирований с [F-18]rhPSMA7-rac) не привели к какому-либо подозрительному или идентифицируемому накоплению F-18 в кости из-за высвобожденного фторида F-18.

Для дальнейшего изучения высвобождения фторида F-18 из [F-18]rhPSMA7-rac (наблюдаемого в одном образце мочи) авторами изобретения исследовано наличие F-18-фторида в других образцах мочи (нормальные мыши) с помощью колонки для ВЭЖХ RP-18 (новая колонка с закрытыми концами RP-18) и ТСХ.

Анализ радио-ТСХ образования F-¹⁸-фторида у нормальных мышей через 30 мин после инъекции.

Для этого применяли нормальных мышей. Образцы мочи собирали с помощью катетера в течение 30 минут. Мочу центрифугировали и непосредственно подвергали ВЭЖХ и ТСХ.

Как показано на фиг. 21, левый столбец, свободный F-¹⁸-фторид был обнаружен в образцах мочи для всех изомеров и также он образуется, когда свежую мочу "инкубируют с [F-¹⁸]rhPSMA7.4. (правый столбец). Идентификацию F-18-фторида проводили путем демонстрации того, что а) этот вид удерживается на картриджах QMA (данные не показаны), б) элюируется в мертвом объеме колонок RP-18 и с) не может удерживаться или мобилизоваться на колонках RP-18 или планшетах для ТСХ RP-18, соответственно, независимо от применяемых подвижных фаз.

В связи с тем, что такие высокие количества фторида F-18 не были обнаружены в анализах ВЭЖХ крови или органов, таких как почки, опухоль, печень и т.д., в исследованиях биораспределения на мышах не наблюдали повышенного поглощения активного вещества в костях и не наблюдали повышенного поглощения активного вещества в костях во время клинических ПЭТ-сканирований с соединением [F-18]rhPSMA7-гас, поскольку [F-18]rhPSMA7-гас был установлен для клинического сканирования в конце 2017 года в Мюнхенском техническом университете (статус на конец июля 2018 г.: приблизительно 1400 сканирований ПЭТ у пациентов с раком предстательной железы), авторы изобретения пришли к выводу, что [F-18] фторид может образовываться после прохождения меткой клубочковой фильтрации, что приводит к образованию и последующему выделению [F-18] фторида без обнаруживаемого поглощения F-18-фторида в крови, органах или костях.

Это предположение подтверждается литературными данными по токсикологии фторида, где описаны соответствующие количества фтора в почках и моче. У мышей наблюдали нормальные уровни фторида в моче 0,3 м.д. (Bouaziz H et al., Fluoride 2005, 38(1):23–31). В другой публикации средняя концентрация фторида в моче нормальных мышей составляла от 0,13 до 0,14 мкг/мл (Poesina ND et al. Rom J Morphol Embryol 2014, 55(2):343-349) и Inkielewicz I. et al. обнаружили, что содержание фторида в сыворотке крови крыс составляет приблизительно 5% от концентрации фторида в почках (сыворотка: 0,051 мкг/мл, почки: 0,942 мкг/мл) (фторид, 36 (4), 263-266). Принимая во внимание, что большая часть индикатора специфически поглощается почками, а также физиологически выводится из них, повышенный уровень фторида в почках в сочетании с температурой тела 36,6 °C может привести к непрерывному выведению F-18- фторида соединений rhPSMA в почках.

Следовательно, свежие и нерадиоактивные образцы мочи, собранные у нормальных мышей, инкубировали с [F-18]rhPSMA7.x в течение различных периодов времени (см. описание к фиг. 21). На фиг. 22, правый столбец, ясно видно, что инкубация мочи с [F-18]rhPSMA7.x ex vivo приводит к образованию свободного [F-18] фторида в различной степени, чему способствуют различные концентрации холодного F-19-Фторида в образцах мочи увеличивается со временем.

Для дальнейшего подтверждения гипотезы к свежей и нерадиоактивной моче мышей добавляли 500 нмоль холодного F-19-фторида с последующим добавлением [F-18]rhPSMA7.3 и инкубацией в течение 2 часов. Согласно гипотезе, высокая концентрация [F-19] фторида должна приводить к образованию значительного количества [F-18]

фторида. На фиг. 23 показано, что в этих условиях происходит обмен 98,5% радиоактивного вещества и образование [F-18] фторида в течение 2 часов (фиг. 23).

Поскольку скорости изотопного обмена зависят от концентрации четырех соответствующих частиц в равновесии ([F-18]фторид, [F-19]фторид, [F-18]rhPSMA7.3 и [F-19]rhPSMA7.3), также исследовали, приводило ли добавление [F-18]фторида к свежей и радиоактивной моче (20,6% [F-18] фторида, 79,4% [F-18]rhPSMA7.3) с последующим добавлением холодного меченного вещества [F-19]rhPSMA7.3 также к мечению радиофармацевтического препарата [F-18]rhPSMA7.3. Неожиданно, даже небольшое количество 5 нмоль [F-19]rhPSMA7.3 в моче, указанное выше, привело к увеличению [F-18]rhPSMA7.3 с 79,4% до 85,8% (F-18]фторид снизился с 20,6% до 14,2%) при комнатной температуре.

Результаты, полученные с помощью изотопного обмена в моче, считаются типичными для всех меток, конъюгированных с фрагментом 4-(ди-трет-бутил[(18)F]фторсилил)бензил)окси и, следовательно, для всех изомеров rhPSAM7.

Доклиническая дозиметрия, биораспределение у человека и поглощение в опухолевых поражениях

Обратите внимание, что в следующем примере 18F-rhPSMA-7 относится к ^{nat}Ga - ^{18}F -rhPSMA7-rac, и ^{18}F -rhPSMA-7.3 к ^{nat}Ga - ^{18}F -rhPSMA7.3.

А) Доклиническая дозиметрия ^{18}F -rhPSMA-7 и ^{18}F -rhPSMA-7.3 у мышей

Цель состояла в том, чтобы оценить распределение и экскрецию ^{18}F -rhPSMA-7 и ^{18}F -rhPSMA-7.3 в различные моменты времени до 300 минут после однократного внутривенного введения мышам и выполнить расчеты для внутренней дозиметрии.

Способы

От 3 до 5 мышам вводили инъекции в каждый момент времени в среднем $25,6 \pm 3,6$ МБк ^{18}F -rhPSMA-7 и $28,5 \pm 4,8$ МБк ^{18}F -rhPSMA-7.3 соответственно. Для экспериментов применяли мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID). Все эксперименты на животных проводили в соответствии с общими правилами защиты животных в Германии руководящими принципами, принятыми в учреждении, по уходу и применению животных.

Мышей умерщвляли в следующие моменты времени:

^{18}F -rhPSMA-7: через 10, 20, 40, 60, 120 и 180 минут после введения.

^{18}F -rhPSMA-7.3: через 10, 60, 120, 180 и 300 минут после введения.

Обратите внимание, что на основании начальных экспериментов, демонстрирующих пролонгированное поглощение почками ^{18}F -rhPSMA-7.3, для заключительных экспериментов применяли позднюю временную точку (300 мин).

Брали следующие ткани/жидкости:

Моча, кровь, сердце, легкие, селезенка, поджелудочная железа, печень, желудок (опорожненный), тонкий кишечник (опорожненный), толстый кишечник (опорожненный), почки, мочевой пузырь, яичко, жир, мышцы (частичные, бедренные), бедренная кость, хвост и мозг. Мочу собирали пипеткой в газовую камеру CO₂. При отсутствии мочеиспускания в камере мочевой пузырь отсасывали инсулиновым шприцем. Кровь брали сразу после умерщвления инсулиновым шприцем из сердца. Все остальные ткани и органы иссекали и переносили непосредственно в пластиковые контейнеры.

Массу образцов в пластиковых контейнерах измеряли с помощью электронных весов. Массу пустых и предварительно промаркированных пластиковых контейнеров для выделенных образцов измеряли заранее. Собственную массу пластиковых контейнеров вычитали из массы измеряемого образца с пластиковым контейнером. Рассчитанную таким образом массу обозначали как массу измеряемого образца.

Пластиковые контейнеры, содержащие измеряемые образцы, помещали в специальные стойки автоматического гамма-счетчика (PerkinElmer - Wallac, Уолтем, США) для измерения скорости счета в течение 60 секунд (количество импульсов в минуту = имп/мин). Кроме того, вместе с образцами измеряли 1% (об./об.) стандарт (n = 5) с известным количеством радиоактивного вещества, чтобы преобразовать скорость счета образцов органов в активность.

Анализ данных

Показатели скорости счета измеряемых образцов автоматически корректировались на распад. Коэффициенты распределения радиоактивности (единица измерения: процент введенной дозы (% ID)) в измеряемых образцах были определены с применением приведенного ниже уравнения. Сумму показателей скорости счета для всех измеряемых образцов, полученных от одной мыши, обозначали как скорость счета для введенного радиоактивного вещества.

Процент введенной дозы (%ID)

$$= \frac{\text{скорость счета измеряемых образцов}}{\text{сумма скорости счета всех измеряемых образцов от одной мыши}} * 100$$

Коэффициент распределения радиоактивного вещества на единицу массы измеряемого образца (единица: % ID/г), исключая образцы мочи и кала, определяли с применением приведенного ниже уравнения. Массу измеряемого образца определяли

путем вычитания массы пустого контейнера для измерения из массы контейнера, содержащего образец.

$$\text{Процент введенной дозы (\%ID/г)} = \frac{\text{Процент введенной дозы (\%ID)}}{\text{масса измеряемого образца (г)}}$$

Дозиметрический анализ

Для согласованности статистических расчетов для каждой радиометки применяли одинаковое количество временных точек для ^{18}F -rhPSMA-7 и ^{18}F -rhPSMA-7.3. Следовательно, для ^{18}F -rhPSMA-7 временные точки 10 минут и 20 минут объединяли с созданием конечной точки 15 минут.

Интеграл по времени активности при накопления в важных исходных органах (AUC) получали как с помощью численного интегрирования, так и физического распада в соответствии с публикацией J Juan et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, 1993, 82:762-763.

Kirshner et al. разработан способ, в котором применяют линейную шкалу процента введенной дозы у животного по отношению массы органов к общей массе тела модельного животного для обоих видов.

- Kirschner AS, Ice RD, Beierwaltes WH. Radiation Dosimetry of ^{131}I -19-Iodocholesterol. J Nucl Med. 1973 Sep 1;14(9):713-7.

- Kirschner A, Ice R, Beierwaltes W. Letters to the editor. J Nucl Med. (1975):248-9.

Кратко, для расчета дозиметрии человека по биораспределению у мышей потребовалась экстраполяция, чтобы учесть различия между животными и людьми. Нормальные дозы облучения органов оценивали для анатомической модели стандартного взрослого человека с массой тела 70 кг с применением концентраций активного вещества в органах в зависимости от времени (в процентах от введенной дозы на грамм, % ID/г) и активного вещества во всем теле, измеренных в исследованиях биораспределения на мышах.

Концентрации активного вещества в ткани у мышей преобразовали в фракционированные активные вещества тканей у стандартного взрослого человека с массой тела 70 кг с применением относительных фракционных масс органов у стандартного взрослого человека и "стандартной" мыши массой 25 грамм. Кривая зависимости от времени активного вещества во всем теле соответствовала экспоненциальной функции, и предполагалось, что разница между введенным активным веществом и активным веществом во всем теле выводится с мочой, поскольку

концентрации активного вещества в печени и метки в желудочно-кишечном тракте были низкими во всех исследуемых точках времени.

Время пребывания в органе рассчитывали путем численного интегрирования с применением правила трапеций, а время пребывания в остальном теле ^{18}F рассчитывали как разность между временем пребывания в организме в целом и суммой значений времени пребывания в органе и в моче. Время пребывания содержимого мочевого пузыря оценивали с применением модели динамического мочеиспускания в дозиметрической программе OLINDA/EXM 1.0. Наконец, с помощью OLINDA/EXM 1.0 рассчитали эквиваленты стандартной средней дозы на орган для взрослого человека (в мЗв/МБк) и эффективную дозу (также в мЗв/МБк).

Окончательный расчет поглощенной дозы радиации и дозиметрия по биораспределению у мышей: тканями или органами, в которых происходит значительное накопление радиоактивного вещества (то есть орган-источник), были почки, селезенка, легкие, печень и сердце. Что касается накопления активного вещества и выведения, было обнаружено быстрое выведение из крови и выведение с мочой, но относительно медленное накопление в почках.

Результаты

Таблица 14. Результаты дозиметрии для ^{18}F -rhPSMA-7 с применением интервала опорожнения мочевого пузыря 3,5 часа.

Орган-мишень	Альфа	Бета	Фотон	Всего	ЭЭД	ЭД
Надпочечники	0,00E000	1,95E-03	5,85E-03	7,80E-03	0,00E000	3,90E-
Мозг	0,00E000	1,95E-03	2,54E-03	4,49E-03	0,00E000	2,24E-
Молочная железа	0,00E000	1,95E-03	2,29E-03	4,24E-03	6,36E-04	2,12E-
Стенка желчного пузыря	0,00E000	1,95E-03	5,54E-03	7,49E-03	0,00E000	
Стенка нижнего отдела толстого кишечника	0,00E000	1,95E-03	1,41E-02	1,61E-02	9,66E-04	1,93E-
Тонкий кишечник	0,00E000	1,95E-03	8,40E-03	1,04E-02	0,00E000	5,18E-
Стенка желудка	0,00E000	1,95E-03	5,05E-03	7,00E-03	0,00E000	8,04E-
Стенка верхнего отдела толстого кишечника	0,00E000	1,95E-03	7,31E-03	9,26E-03	0,00E000	4,63E-

Стенка сердца	0,00E000	8,82E-04	3,54E-03	4,42E-03	0,00E000	
Почки	0,00E000	4,70E-02	1,80E-02	6,51E-02	3,91E-03	3,25E-
Печень	0,00E000	6,35E-04	3,63E-03	4,27E-03	0,00E000	2,13E-
Легкие	0,00E000	1,25E-03	3,04E-03	4,03E-03	5,16E-04	5,16E-
Мышца	0,00E000	1,95E-03	5,73E-03	7,68E-03	0,00E000	3,84E-
Яичники	0,00E000	1,95E-03	1,35E-02	1,55E-02	3,87E-03	3,09E-
Поджелудочная железа	0,00E000	1,95E-03	6,13E-03	8,08E-03	0,00E000	4,04E-
Красный костный мозг	0,00E000	1,39E-03	5,41E-03	6,08E-03	8,16E-04	8,16E-
Остеогенные клетки	0,00E000	4,18E-03	4,75E-03	8,93E-03	2,68E-04	8,93E-
Кожа	0,00E000	1,95E-03	2,98E-03	4,93E-03	0,00E000	4,93E-
Селезенка	0,00E000	1,59E-02	1,01E-02	2,61E-02	1,56E-03	1,30E-
Семенники	0,00E000	1,95E-03	9,69E-03	1,16E-02	0,00E000	
Тимус	0,00E000	1,95E-03	3,24E-03	5,18E-03	0,00E000	2,59E-
Щитовидная железа	0,00E000	1,95E-03	3,23E-03	5,18E-03	1,55E-04	2,59E-
Стенка мочевого пузыря	0,00E000	2,45E-01	1,08E-01	3,54E-01	2,12E-02	1,77E-
Матка	0,00E000	1,95E-03	2,61E-02	2,80E-02	1,68E-03	1,40E-
Все тело	0,00E000	2,37E-03	5,39E-03	7,77E-03	0,00E000	
ЭЭД - эффективная эквивалентная доза (мЗв/МБк) 3,56E-02						
ЭД - эффективная доза (мЗв/МБк) 2,66E-02						

Таблица 15. Результаты дозиметрии для ^{18}F -rhPSMA-7 с применением интервала опорожнения мочевого пузыря 1,0 ч.

Орган-мишень	Альфа	Бета	Фотон	Всего	ЭЭД	ЭД
Надпочечники	0,00E000	1,95E-03	5,64E-03	7,59E-03	0,00E000	3,79E-
Мозг	0,00E000	1,95E-03	2,54E-03	4,49E-03	0,00E000	2,24E-
Молочная железа	0,00E000	1,95E-03	2,25E-03	4,20E-03	6,30E-04	2,10E-
Стенка желчного пузыря	0,00E000	1,95E-03	4,96E-03	6,91E-03	0,00E000	
Стенка нижнего отдела толстого кишечника	0,00E000	1,95E-03	7,25E-03	9,20E-03	5,52E-04	1,10E-

Тонкий кишечник	0,00E000	1,95E-03	5,79E-03	7,73E-03	0,00E000	3,87E-
Стенка желудка	0,00E000	1,95E-03	4,70E-03	6,65E-03	0,00E000	7,98E-
Стенка верхнего отдела толстого кишечника	0,00E000	1,95E-03	5,33E-03	7,27E-03	0,00E000	3,64E-
Стенка сердца	0,00E000	8,82E-04	3,48E-03	4,36E-03	0,00E000	
Почки	0,00E000	4,70E-02	1,76E-02	6,47E-02	3,88E-03	3,23E-
Печень	0,00E000	6,35E-04	3,39E-03	4,02E-03	0,00E000	2,01E-
Легкие	0,00E000	1,25E-03	3,01E-03	4,26E-03	5,11E-04	5,11E-
Мышца	0,00E000	1,95E-03	4,01E-03	5,96E-03	0,00E000	2,98E-
Яичники	0,00E000	1,95E-03	7,21E-03	9,16E-03	2,29E-03	1,83E-
Поджелудочная железа	0,00E000	1,95E-03	5,86E-03	7,80E-03	0,00E000	3,90E-
Красный костный мозг	0,00E000	1,39E-03	4,29E-03	5,68E-03	6,82E-04	6,82E-
Остеогенные клетки	0,00E000	4,18E-03	4,09E-03	8,27E-03	2,48E-04	8,27E-
Кожа	0,00E000	1,95E-03	2,38E-03	4,32E-03	0,00E000	4,32E-
Селезенка	0,00E000	1,59E-02	9,09E-03	2,58E-02	1,55E-03	1,29E-
Семенники	0,00E000	1,95E-03	5,09E-03	7,03E-03	0,00E000	
Тимус	0,00E000	1,95E-03	3,20E-03	5,15E-03	0,00E000	2,57E-
Щитовидная железа	0,00E000	1,95E-03	3,23E-03	5,17E-03	1,55E-04	2,59E-
Стенка мочевого пузыря	0,00E000	7,87E-02	3,66E-02	1,15E-01	6,92E-03	5,76E-
Матка	0,00E000	1,95E-03	1,12E-02	1,31E-02	7,87E-04	6,56E-
Все тело	0,00E000	2,27E-03	3,93E-03	6,19E-03	0,00E000	
ЭЭД - эффективная эквивалентная доза (мЗв/МБк) 1,82E-02						
ЭД - эффективная доза (мЗв/МБк) 1,22E-02						

Таблица 16. Результаты дозиметрии для ^{18}F -rhPSMA-7.3 с применением интервала опорожнения мочевого пузыря 3,5 часа.

Орган-мишень	Альфа	Бета	Фотон	Всего	ЭЭД	ЭД
Надпочечники	0,00E000	3,12E-03	7,93E-03	1,10E-02	0,00E000	5,52E-
Мозг	0,00E000	3,12E-03	4,07E-03	7,19E-03	0,00E000	3,59E-
Молочная железа	0,00E000	3,12E-03	3,55E-03	6,67E-03	1,00E-03	3,34E-

Стенка желчного пузыря	0,00E000	3,12E-03	7,46E-03	1,06E-02	0,00E000	
Стенка нижнего отдела толстого кишечника	0,00E000	3,12E-03	1,28E-02	1,59E-02	9,53E-04	1,91E-
Тонкий кишечник	0,00E000	3,12E-03	9,42E-03	1,25E-02	0,00E000	6,27E-
Стенка желудка	0,00E000	3,12E-03	7,02E-03	1,01E-02	0,00E000	1,22E-
Стенка верхнего отдела толстого кишечника	0,00E000	3,12E-03	8,57E-03	1,17E-02	0,00E000	5,85E-
Стенка сердца	0,00E000	1,32E-03	5,39E-03	6,71E-03	0,00E000	
Почки	0,00E000	5,11E-02	2,07E-02	7,18E-02	4,31E-03	3,59E-
Печень	0,00E000	9,70E-04	5,02E-03	5,99E-03	0,00E000	3,00E-
Легкие	0,00E000	1,95E-03	4,66E-03	6,61E-03	7,93E-04	7,93E-
Мышца	0,00E000	3,12E-03	6,55E-03	9,67E-03	0,00E000	4,83E-
Яичники	0,00E000	3,12E-03	1,26E-02	1,57E-02	3,92E-03	3,14E-
Поджелудочная железа	0,00E000	3,12E-03	8,29E-03	1,14E-02	0,00E000	5,70E-
Красный костный мозг	0,00E000	2,22E-03	6,79E-03	9,01E-03	1,08E-03	1,08E-
Остеогенные клетки	0,00E000	6,70E-03	6,52E-03	1,32E-02	3,97E-04	1,32E-
Кожа	0,00E000	3,12E-03	3,83E-03	6,95E-03	0,00E000	6,95E-
Селезенка	0,00E000	1,52E-02	1,15E-02	2,67E-02	1,60E-03	1,34E-
Семенники	0,00E000	3,12E-03	8,96E-03	1,21E-02	0,00E000	
Тимус	0,00E000	3,12E-03	5,08E-03	8,20E-03	0,00E000	4,10E-
Щитовидная железа	0,00E000	3,12E-03	5,15E-03	8,27E-03	2,48E-04	4,14E-
Стенка мочевого пузыря	0,00E000	1,56E-01	7,14E-02	2,27E-01	1,36E-02	1,14E-
Матка	0,00E000	3,12E-03	2,04E-02	2,36E-02	1,41E-03	1,18E-
Все тело	0,00E000	3,52E-03	6,33E-03	9,86E-03	0,00E000	
ЭЭД - эффективная эквивалентная доза (мЗв/МБк) 2,94E-02						
ЭД - эффективная доза (мЗв/МБк) 2,17E-02						

Таблица 17. Результаты дозиметрии для ^{18}F -rhPSMA-7.3 с применением интервала опорожнения мочевого пузыря 1,0 ч.

Орган-мишень	Альфа	Бета	Фотон	Всего	ЭЭД	ЭД
Надпочечники	0,00E000	3,12E-03	7,79E-03	1,09E-02	0,00E000	5,46E-
Мозг	0,00E000	3,12E-03	4,06E-03	7,18E-03	0,00E000	3,59E-
Молочная железа	0,00E000	3,12E-03	3,53E-03	6,65E-03	9,97E-04	3,32E-
Стенка желчного пузыря	0,00E000	3,12E-03	7,11E-03	1,02E-02	0,00E000	
Стенка нижнего отдела толстого кишечника	0,00E000	3,12E-03	8,45E-03	1,16E-02	6,94E-04	1,39E-
Тонкий кишечник	0,00E000	3,12E-03	7,78E-03	1,09E-02	0,00E000	5,45E-
Стенка желудка	0,00E000	3,12E-03	6,80E-03	9,92E-03	0,00E000	1,19E-
Стенка верхнего отдела толстого кишечника	0,00E000	3,12E-03	7,33E-03	1,05E-02	0,00E000	5,23E-
Стенка сердца	0,00E000	1,32E-03	5,36E-03	6,68E-03	0,00E000	
Почки	0,00E000	5,11E-02	2,04E-02	7,16E-02	4,29E-03	3,58E-
Печень	0,00E000	9,70E-04	4,87E-03	5,84E-03	0,00E000	2,92E-
Легкие	0,00E000	1,95E-03	4,63E-03	6,58E-03	7,90E-04	7,90E-
Мышца	0,00E000	3,12E-03	5,47E-03	8,59E-03	0,00E000	4,30E-
Яичники	0,00E000	3,12E-03	8,61E-03	1,17E-02	2,93E-03	2,35E-
Поджелудочная железа	0,00E000	3,12E-03	8,12E-03	1,12E-02	0,00E000	5,62E-
Красный костный мозг	0,00E000	2,22E-03	6,09E-03	8,31E-03	9,97E-04	9,97E-
Остеогенные клетки	0,00E000	6,70E-03	6,11E-03	1,28E-02	3,84E-04	1,28E-
Кожа	0,00E000	3,12E-03	3,45E-03	6,57E-03	0,00E000	6,57E-
Селезенка	0,00E000	1,52E-02	1,14E-02	2,66E-02	1,59E-03	1,33E-
Семенники	0,00E000	3,12E-03	6,08E-03	9,20E-03	0,00E000	
Тимус	0,00E000	3,12E-03	5,06E-03	8,18E-03	0,00E000	4,09E-
Щитовидная железа	0,00E000	3,12E-03	5,15E-03	8,27E-03	2,48E-04	4,13E-
Стенка мочевого пузыря	0,00E000	5,18E-02	2,66E-02	7,84E-02	4,70E-03	3,92E-

Матка	0,00E000	3,12E-03	1,11E-02	1,43E-02	8,55E-04	7,13E-
Все тело	0,00E000	3,45E-03	5,42E-03	8,87E-03	0,00E000	
ЭЭД - эффективная эквивалентная доза (мЗв/МБк) 1,85E-02						
ЭД - эффективная доза (мЗв/МБк) 1,28E-02						

Заключение

Самые высокие коэффициенты распределения радиоактивного вещества наблюдали в почках после инъекции ^{18}F -rhPSMA-7 и ^{18}F -rhPSMA-7.3 во все исследуемые моменты времени у мышей. Более того, коэффициент был высоким в селезенке и мочевом пузыре для обеих радиометок по сравнению со всеми другими оцениваемыми тканями, где отношения активных веществ составляли менее 8% ID/г.

Поскольку большая часть активных веществ ^{18}F -rhPSMA-7/ ^{18}F -rhPSMA-7.3 накапливается в почках и выведение через мочевой пузырь демонстрирует высокий уровень активных веществ, основной путь выведения определяется через почки и мочевыводящую систему.

При интервале опорожнения мочевого пузыря 3,5 часа и 1,0 часа экстраполированные общие эффективные дозы составили 2,66E-02 и 1,22E-02 мЗв/МБк для ^{18}F -rhPSMA-7 и 2,17E-02 и 1,28E-02 мЗв/МБк для ^{18}F -rhPSMA-7.3 соответственно. Инъекция до 370 МБк (10 мКи) для клинического сканирования приведет к благоприятному радиационному облучению менее 5 мЗв для обоих агентов при условии интервала между мочеиспусканием 1 час.

Различия, которые стоит упомянуть между обоими радиоактивными метками, очевидны только в отношении поглощения почками, поскольку ^{18}F -rhPSMA-7.3 имеет тенденцию накапливаться более постепенно с более длительным удерживанием. Тем не менее, облучение обоих агентов сравнимо.

В) Биораспределение и поглощение ^{18}F -rhPSMA-7 и ^{18}F -rhPSMA-7.3 у человека в опухолевых поражениях.

В следующих разделах описано биораспределение ^{18}F -rhPSMA-7 и ^{18}F -rhPSMA-7.3. Исследование обоснованности концепции проводили при применении из гуманных соображений. Агент применяли в соответствии с Законом о лекарственных средствах Германии, AMG §13 2b, и в соответствии с полномочиями регулирующего органа (правительство Обербайерна).

Всех пациентов обследовали на мКТ-сканере Biograph (Siemens Medical Solutions, Эрланген, Германия). Все сканы ПЭТ получали в 3D-режиме со временем сбора данных от 2 до 4 мин в лежачем положении. Данные выбросов были скорректированы на

случайность, мертвое время, разброс и затухание и были восстановлены итеративно с помощью алгоритма максимизации ожидания упорядоченных подмножеств (четыре итерации, восемь подмножеств) с последующим сглаживающим фильтром Гаусса после реконструкции (полная ширина 5 мм на половине максимум).

Способы

Биораспределение у человека оценивали путем анализа клинических исследований ^{18}F -rhPSMA-7- и ^{18}F -rhPSMA-7.3-ПЭТ/КТ у 47 и 32 пациентов, соответственно. Среднее значение активности введенного активного вещества составляло 324 (диапазон от 236 до 424) МБк по сравнению с 345 (диапазон от 235 до 420) МБк, а время поглощения составляло 84 (диапазон от 42 до 166) мин и 76 (диапазон от 59 до 122) мин для ^{18}F -rhPSMA-7 по сравнению с ^{18}F -rhPSMA-7.3 соответственно.

Среднее и максимальное стандартизованные показатели накопления ($\text{SUV}_{\text{среднее}}/\text{SUV}_{\text{макс}}$) определяли для фона (ягодичная мышца), нормальных органов (слюнных желез, пула крови, легких, печени, селезенки, поджелудочной железы, двенадцатиперстной кишки, почки, мочевого пузыря, кости) и трех типичных опухолевых поражений. Поглощение опухолью анализировали в 89 очагах поражения (26 первичных опухолей/местные рецидивы, 23 кости, 38 лимфатических узлов и 2 очага висцеральных метастаз) и 63 очагах поражения (14 первичных опухолей/местные рецидивы, 30 костей, 18 лимфатических узлов и 1 очаг висцеральных метастаз) для ^{18}F -rhPSMA-7 и ^{18}F -rhPSMA-7.3 соответственно.

Для расчета SUV круговые области интереса были нарисованы вокруг областей с фокусным повышенным поглощением в трансаксиальных срезах и автоматически адаптированы к трехмерному интересующему объему (VOI) при изоконтуре 50%. Были рассчитаны отношения орган-фон и опухоль-фон.

Результаты

Биораспределение ^{18}F -rhPSMA-7 и ^{18}F -rhPSMA-7.3 у человека показало типичную картину, известную для других лигандов PSMA. Параметры поглощения ^{18}F -rhPSMA-7 и ^{18}F -rhPSMA-7.3 были очень похожи с более низким уровнем накопления в мочевом пузыре и более высоким поглощением в опухолевых поражениях для ^{18}F -rhPSMA-7.3: $\text{SUV}_{\text{среднее}}$ для ^{18}F -rhPSMA-7 по сравнению с ^{18}F -rhPSMA-7.3 составило 16,9 по сравнению с 16,0 (околоушная железа), 19,6 по сравнению с 19,6 (поднижнечелюстная железа), 2,0 по сравнению с 1,9 (пул крови), 0,7 по сравнению с 0,7 (легкие), 7,0 по сравнению с 7,3 (печень), 9,1 по сравнению с 8,5 (селезенка), 32,4 по сравнению с 35,5 (почка), 2,5 по сравнению с 2,8 (поджелудочная железа), 10,9 по сравнению с 11,0 (двенадцатиперстная кишка), 1,1 по сравнению с 1,3 (здоровая кость) и 10,2 по сравнению

с 2,0 (мочевой пузырь) для ^{18}F -rhPSMA-7 по сравнению с ^{18}F -rhPSMA-7.3 соответственно. В частности, значения поглощения ^{18}F -rhPSMA-7.3 по сравнению с ^{18}F -rhPSMA-7 были значительно ниже для удержания в мочевом пузыре ($2,0 \pm 0,8$ по сравнению с $6,3 \pm 21,2$, $p < 0,05$) и значительно выше для опухолевых поражений ($32,5 \pm 42,7$ по сравнению с $20,0 \pm 20,2$, $p < 0,05$).

Таблица 18. SUV_{макс} и SUV_{среднее} нормальных органов и опухолевых поражений с применением ^{18}F -rhPSMA-7. Данные показаны как среднее, минимальное и максимальное значения.

	SUV _{макс}			SUV _{среднее}		
	среднее	минимум	максимум	среднее	минимум	максимум
Фон	1,0	0,6	1,8	0,6	0,4	1,2
Околоушная железа	23,8	8,2	42,3	16,9	5,5	32,7
Поднижнечелюстная железа	27,0	10,1	43,8	19,6	7,0	29,7
Пул крови	2,4	1,6	3,9	2,0	1,1	17,0
Легкие	1,1	0,5	3,1	0,7	0,3	2,0
Печень	9,5	4,5	25,2	7,0	3,2	17,7
Селезенка	11,8	4,7	21,0	9,1	3,4	17,1
Почка	44,8	19,1	75,2	32,4	13,2	54,7
Поджелудочная железа	3,7	1,8	7,9	2,5	1,3	5,5
Двенадцатиперстная кишка	14,8	2,8	32,7	10,9	1,9	23,9
Кость	1,7	0,8	3,1	1,1	0,6	2,1
Мочевой пузырь	8,5	0,5	112,0	6,3	0,3	85,7
Опухоль	27,6	3,1	167,2	20,0	2,1	115,7

Таблица 19. SUV_{макс} и SUV_{среднее} нормальных органов и опухолевых поражений с применением ^{18}F -rhPSMA-7.3. Данные показаны как среднее, минимальное и максимальное значения.

	SUV _{макс}			SUV _{среднее}		
	среднее	минимум	максимум	среднее	минимум	максимум
Фон	1,0	0,6	1,7	0,7	0,4	1,1
Околоушная железа	24,6	11,2	38,3	16,0	8,2	25,0

Поднижнечелюстная железа	28,4	14,6	47,4	19,6	10,4	33,4
Пул крови	2,8	1,9	3,9	1,8	1,3	2,5
Легкие	1,1	0,7	1,9	0,7	0,4	1,1
Печень	9,7	4,6	15,4	7,3	3,2	12,3
Селезенка	11,4	5,0	22,5	8,5	3,7	17,9
Почка	51,9	30,9	99,9	35,5	20,7	70,6
Поджелудочная железа	4,2	2,4	7,8	2,8	1,6	5,2
Двенадцатиперстная кишка	16,4	6,1	32,2	11,0	3,0	23,0
Кость	2,1	1,1	3,4	1,3	0,7	2,2
Мочевой пузырь	3,1	1,1	6,0	2,0	0,7	4,1
Опухоль	44,0	2,4	316,0	32,5	1,6	224,1

Таблица 20. Отношение SUV_{макс} и SUV_{среднее} к фону нормальных органов и опухолевых поражений с применением ¹⁸F-rhPSMA-7. Данные показаны как среднее, минимальное и максимальное значения.

	Отношение SUV _{макс}			Отношение SUV _{среднее}		
	среднее	минимум	максимум	среднее	минимум	максимум
Околоушная железа	25,2	8,2	45,3	28,3	9,2	54,5
Поднижнечелюстная железа	28,7	10,1	54,7	33,3	11,7	61,8
Пул крови	2,5	1,3	4,8	3,2	1,6	21,3
Легкие	1,1	0,4	3,3	1,1	0,4	4,0
Печень	10,4	4,7	42,0	11,9	4,6	44,3
Селезенка	12,5	4,7	35,0	15,1	5,7	39,5
Почка	48,1	18,2	98,7	55,2	19,8	109,3
Поджелудочная железа	3,9	1,5	11,3	4,3	1,9	10,8
Двенадцатиперстная кишка	15,7	2,8	31,3	18,4	3,2	35,3
Кость	1,7	0,9	2,9	1,8	1,0	3,2
Мочевой пузырь	8,7	0,6	112,0	10,2	0,5	142,8

Опухоль	32,0	3,1	278,6	36,0	3,5	289,3
---------	------	-----	-------	------	-----	-------

Таблица 21. Отношение SUV_{макс} и SUV_{среднее} к фону нормальных органов и опухолевых поражений с применением ¹⁸F-rhPSMA-7.3. Данные показаны как среднее, минимальное и максимальное значения.

	Отношение SUV _{макс}			Отношение SUV _{среднее}		
	среднее	минимум	максимум	среднее	минимум	максимум
Околоушная железа	24,7	11,9	46,2	25,2	12,4	44,6
Поднижнечелюстная железа	28,2	14,0	62,1	30,6	15,7	62,3
Пул крови	2,8	1,5	5,2	2,9	1,7	4,9
Легкие	1,0	0,6	1,8	1,0	0,6	1,8
Печень	9,7	4,0	19,0	11,4	4,1	20,7
Селезенка	11,4	3,6	22,4	13,3	3,9	28,6
Почка	51,8	25,7	93,0	55,6	27,6	95,5
Поджелудочная железа	4,1	2,2	6,9	4,4	2,3	7,8
Двенадцатиперстная кишка	16,2	6,9	34,3	17,1	4,7	39,4
Кость	2,0	1,1	3,2	2,1	1,0	3,6
Мочевой пузырь	3,1	0,9	5,5	3,1	0,9	6,8
Опухоль	43,6	1,7	321,2	50,8	1,8	356,4

Заключение:

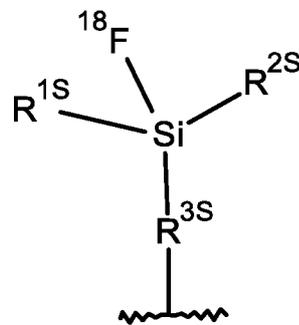
Биораспределение у человека схоже между ¹⁸F-rhPSMA-7 и ¹⁸F-rhPSMA-7.3 для большинства нормальных органов. Однако накопление метки в мочевом пузыре значительно ниже, а накопление в опухолевых очагах значительно выше для ¹⁸F-rhPSMA-7.3, что дает явное преимущество для клинической визуализации. Примеры визуализации с благоприятным биораспределением человека и высоким накоплением опухолевыми поражениями ¹⁸F-rhPSMA-7.3 показаны на фигуре 28.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат лиганд-SIFA-хелатор, содержащий в одной молекуле три отдельных фрагмента:

- (a) один или более лигандов, способных связываться с PSMA,
- (b) фрагмент акцептора кремнефторида (SIFA), содержащий ковалентную связь между атомом кремния и атомом фтора ^{18}F , и
- (c) одну или более хелатирующих групп, содержащих хелатированный нерадиоактивный катион металла.

2. Конъюгат по п. 1, где фрагмент акцептора кремнефторида (SIFA) имеет структуру, представленную формулой (I):



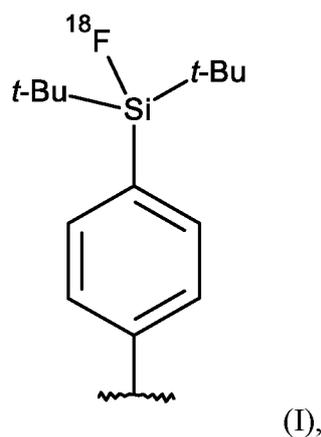
(I),

где $\text{R}^{1\text{S}}$ и $\text{R}^{2\text{S}}$ независимо представляют собой линейную или разветвленную C3-C10 алкильную группу,

$\text{R}^{3\text{S}}$ представляет собой C1-C20 углеводородную группу, содержащую одно или более ароматических и/или алифатических звеньев и/или до 3 гетероатомов, выбранных из O и S,

и где фрагмент SIFA присоединен к остальной части конъюгата через связь, обозначенную как .

3. Конъюгат по п. 2, где фрагмент акцептора кремнефторида (SIFA) имеет структуру, представленную формулой (Ia):



где *t*-Bu представляет собой трет-бутильную группу.

4. Конъюгат по любому из пп. 1-3, где хелатирующая группа содержит по меньшей мере одну из

(i) макроциклической кольцевой структуры, имеющей от 8 до 20 кольцевых атомов, из которых 2 или более представляют собой гетероатомы, выбранные из атомов кислорода и атомов азота,

(ii) ациклической хелатирующей структуры с открытой цепью, имеющей от 8 до 20 атомов основной цепи, из которых 2 или более представляют собой гетероатомы, выбранные из атомов кислорода и атомов азота, или

(iii) разветвленной хелатирующей структуры, содержащей четвертичный атом углерода.

5. Конъюгат по п. 4, где хелатирующая группа выбрана из бис(карбоксиметил)-1,4,8,11-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекана (CBTE2a), циклогексил-1,2-диаминтетрауксусной кислоты (CDTA), 4-(1,4,8,11-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекан-1-ил)метилбензойной кислоты (CPTA), N'-[5-[ацетил(гидрокси)амино]пентил]-N-[5-[[4-[5-аминопентил-(гидрокси)амино]-4-оксобутаноил]амино]пентил]-N-гидроксипутандиамида (DFO), 4,11-бис(карбоксиметил)-1,4,8,11-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекана (DO2A), 1,4,7,10-тетрациклододекан-N,N',N'',N'''-тетрауксусной кислоты (DOTA), α-(2-карбоксиэтил)-1,4,7,10-тетраазабициклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты (DOTAGA), 1,4,7,10-тетраазабициклододекан-N,N',N'',N'''-1,4,7,10-тетра(метилен)фосфоновой кислоты (DOTMP), N,N'-дипиридоксилэтилендиамин-N,N'-диацетат-5,5'-бис(фосфата) (DPDP), диэтилентриамин-N,N',N''-пента(метилен)фосфоновой кислоты (DTMP), диэтилентриаминпентауксусной кислоты (DTPA), этилендиамин-N,N'-тетрауксусной кислоты (EDTA), этиленгликоль-O,O-бис(2-аминоэтил)-N,N',N''-тетрауксусной кислоты (EGTA), N,N-бис(гидроксибензил)этилендиамин-N,N'-диуксусной кислоты (HBED), гидроксиэтилдиаминтриуксусной кислоты (HEDTA), 1-(*p*-нитробензил)-1,4,7,10-тетраазабициклододекан-4,7,10-триацетата (HP-DOA3), 6-гидразинил-N-метилпиридин-3-

карбоксамид (HYNIC), тетра-3-гидрокси-N-метил-2-пиридинон хелаторов (4-((4-(3-(бис(2-(3-гидрокси-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-4-карбоксамидо)этил)амино)-2-((бис(2-(3-гидрокси-1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-4-карбоксамидо)этил)амино)метил)пропил)фенил)амино)-4-оксобутановой кислоты, сокращенно Me-3,2-НОРО, 1,4,7-триазациклононан-1-янтарная кислота-4,7-диуксусной кислоты (NODASA), 1-(1-карбокси-3-карбоксипропил)-4,7-(карбоокси)-1,4,7-триазациклононана (NODAGA), 1,4,7-триазациклононантриуксусной кислоты (NOTA), 4,11-бис(карбоксиметил)-1,4,8,11-тетраазабицикло[6.6.2]гексадекана (TE2A), 1,4,8,11-тетраазациклододекан-1,4,8,11-тетрауксусной кислоты (TETA), трис(гидроксипиридинона) (THP), терпиридин-бис(метиленаминтетрауксусной кислоты (TMT), 1,4,7-триазациклононан-1,4,7-трис[метилен(2-карбоксиэтил)фосфиновой кислоты] (TRAP), 1,4,7,10-тетраазациклотридекан-N,N',N'',N'''-тетрауксусной кислоты (TRITA), 3-[[4,7-бис[[2-карбоксиэтил(гидрокси)фосфорил]метил]-1,4,7-триазонан-1-ил]метилгидроксифосфорил]пропановой кислоты и триэтилететраамингексауксусной кислоты (ТТНА).

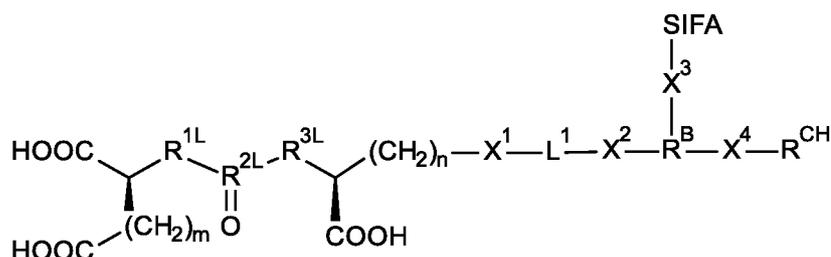
6. Конъюгат по любому из пп. 1-5, где хелатирующая группа представляет собой 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N,N',N'',N'''-тетрауксусную кислоту (DOTA), α -(2-карбоксиэтил)-1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусную кислоту (DOTAGA) или 1,4,7-триазациклононан-1,4,7-трис[метилен(2-карбоксиэтил)фосфиновую кислоту] (TRAP).

7. Конъюгат по любому из пп. 1-6, где хелатор содержит хелатированный нерадиоактивный катион, выбранный из катионов Sc, Cu, Ga, Y, In, Tb, Ho, Lu, Re, Pb, Bi, Ac, Th или Er.

8. Конъюгат по п. 7, где хелатор содержит хелатированный нерадиоактивный катион, выбранный из катионов Ga или Lu.

9. Конъюгат по п. 8, где хелатор содержит хелатированный нерадиоактивный катион, выбранный из катионов Ga³⁺.

10. Конъюгат по любому из пп. 1-9, представляющий собой соединение формулы (III):



(III)

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

SIFA представляет собой фрагмент акцептора кремнефторида (SIFA), содержащий ковалентную связь между атомом кремния и атомом фтора ^{18}F ,

m равно целому числу от 2 до 6,

n равно целому числу от 2 до 6,

$\text{R}^{1\text{L}}$ представляет собой CH_2 , NH или O ,

$\text{R}^{3\text{L}}$ представляет собой CH_2 , NH или O ,

$\text{R}^{2\text{L}}$ представляет собой C или $\text{P}(\text{OH})$,

X^1 выбран из амидной связи, простой эфирной связи, тиоэфирной связи, сложноэфирной связи, сложной тиоэфирной связи, мочевиного мостика и аминной связи,

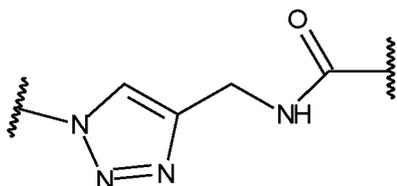
X^2 выбран из амидной связи, простой эфирной связи, тиоэфирной связи, сложноэфирной связи, сложной тиоэфирной связи, мочевиного мостика и аминной связи,

L^1 представляет собой двухвалентную линкерную группу со структурой, выбранной из олигоамида, олигоэфира, олиготиоэфира, сложного олигоэфира, сложного олиготиоэфира, олигомочевины, олиго(эфир-амида), олиго(тиоэфир-амида), олиго(сложный эфир-амида), олиго(сложный тиоэфир-амида), олиго(мочевина-амида), олиго(эфир-тиоэфира), олиго(эфир-сложного эфира), олиго(эфир-сложного тиоэфира), олиго(эфир-мочевины), олиго(тиоэфир-сложного эфира), олиго(тиоэфир-сложного тиоэфира), олиго(тиоэфир-мочевины), олиго(сложный эфир-сложного тиоэфира), олиго(сложный эфир-мочевины) и олиго(сложный тиоэфир-мочевины), где L^1 необязательно замещен одним или более заместителями, независимо выбранными из $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{COOH}$, $-\text{COOCH}_3$, NH_2 и $\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$,

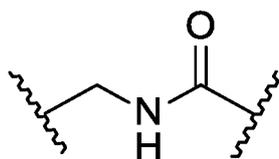
X^3 выбран из амидной связи, сложноэфирной связи, простого эфира и амина,

R^{B} представляет собой трехвалентную линкерную группу,

X^4 выбран из амидной связи, простой эфирной связи, тиоэфирной связи, сложноэфирной связи, сложной тиоэфирной связи, мочевиного мостика, аминной связи, линкерной группы формулы:



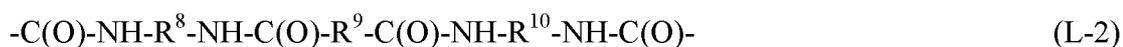
где амидная связь, обозначенная как , образована с хелатирующей группой, и другая связь, обозначенная как , связана с R^{B} и линкерной группой формулы:



где связь, обозначенная как , на карбонильном конце, образована с хелатирующей группой, и другая связь, обозначенная как , связана с R^B ,

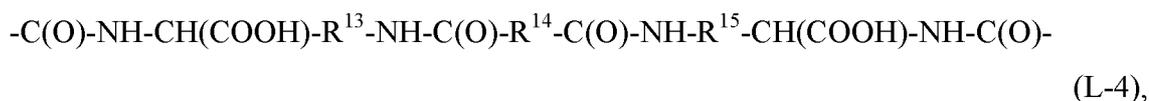
R^{CH} представляет собой хелатирующую группу, содержащую хелатированный нерадиоактивный катион.

11. Конъюгат по п. 10, где $-X^1-L^1-X^2-$ представляет собой одну из следующих структур (L-1) и (L-2):



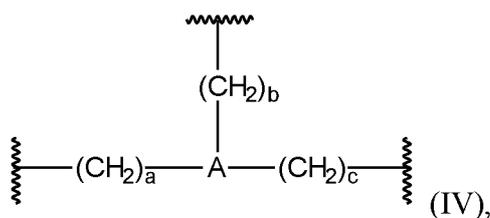
где R^6-R^{10} независимо выбраны из C2-C10 алкилена, где каждая из указанных алкиленовых групп может быть замещена одним или более заместителями, независимо выбранными из $-OH$, $-OCH_3$, $-COOH$, $-COOCH_3$, $-NH_2$ и $-NHC(NH)NH_2$, или

где $-X^1-L^1-X^2-$ представляет собой одну из следующих структур (L-3) и (L-4):



где $R^{11}-R^{15}$ независимо выбраны из C2-C8 алкилена.

12. Конъюгат по п. 10 или п. 11, где R^B имеет структуру, представленную формулой (IV):



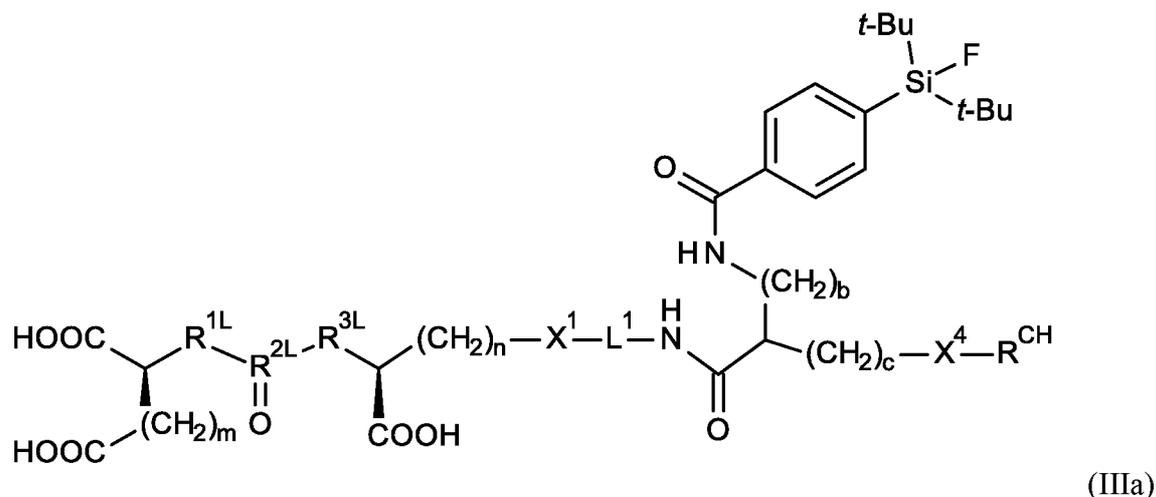
где: A выбран из N, CR^{16} , где R^{16} представляет собой H или C1-C6 алкил, и 5-7-членной карбоциклической или гетероциклической группы,

связь, обозначенная как  в $(CH_2)_a$, образована с X_2 , и a равно целому числу от 0 до 4,

связь, обозначенная как  в $(CH_2)_b$, образована с X^3 , и b равно целому числу от 0 до 4, и

связь, обозначенная как  в $(CH_2)_c$, образована с X^4 , и c равно целому числу от 0 до 4.

13. Конъюгат по любому из пп. 10-12, представляющий собой соединение формулы (Ша):



или его фармацевтически приемлемую соль, где:

m равно целому числу от 2 до 6,

n равно целому числу от 2 до 6,

b равно целому числу от 0 до 4,

c равно целому числу от 0 до 4,

R^{1L} представляет собой CH_2 , NH или O ,

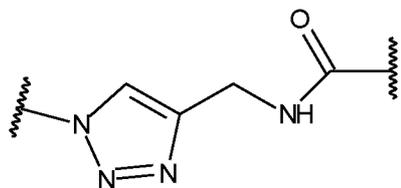
R^{3L} представляет собой CH_2 , NH или O ,

R^{2L} представляет собой C или $P(OH)$,

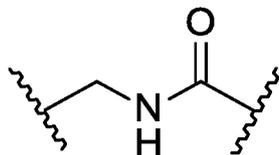
X^1 выбран из амидной связи, простой эфирной связи, тиоэфирной связи, сложноэфирной связи, сложной тиоэфирной связи, мочевиного мостика и аминной связи,

L^1 представляет собой двухвалентную линкерную группу со структурой, выбранной из олигоамида, олигоэфира, олиготиоэфира, сложного олигоэфира, сложного олиготиоэфира, олигомочевины, олиго(эфир-амида), олиго(тиоэфир-амида), олиго(сложный эфир-амида), олиго(сложный тиоэфир-амида), олиго(мочевина-амида), олиго(эфир-тиоэфира), олиго(эфир-сложного эфира), олиго(эфир-сложного тиоэфира), олиго(эфир-мочевины), олиго(тиоэфир-сложного эфира), олиго(тиоэфир-сложного тиоэфира), олиго(тиоэфир-мочевины), олиго(сложный эфир-сложного тиоэфира), олиго(сложный эфир-мочевины) и олиго(сложный тиоэфир-мочевины), где L^1 необязательно замещен одним или более заместителями, независимо выбранными из $-OH$, $-OCH_3$, $-COOH$, $-COOCH_3$, NH_2 и $NHC(NH)NH_2$,

X^4 выбран из амидной связи, простой эфирной связи, тиоэфирной связи, сложноэфирной связи, сложной тиоэфирной связи, мочевиного мостика, аминной связи, линкерной группы формулы:



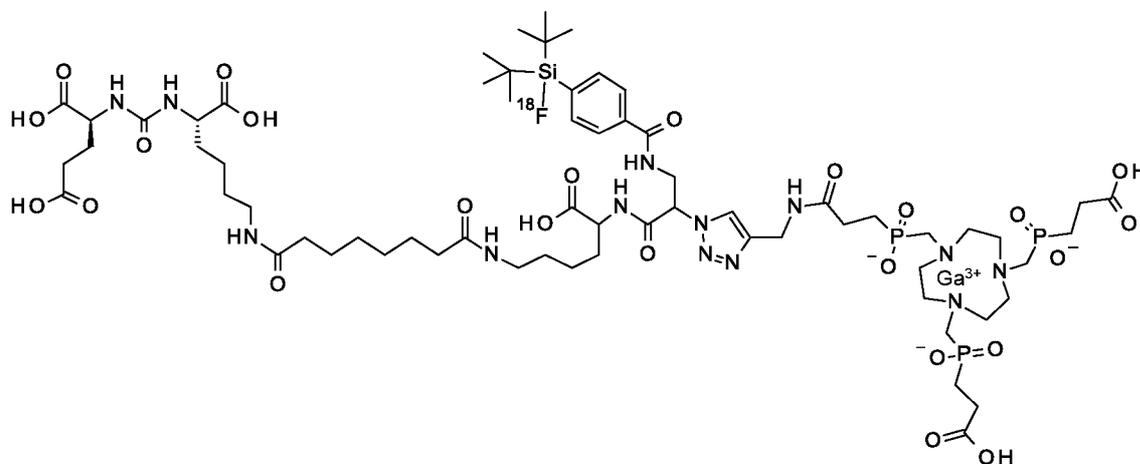
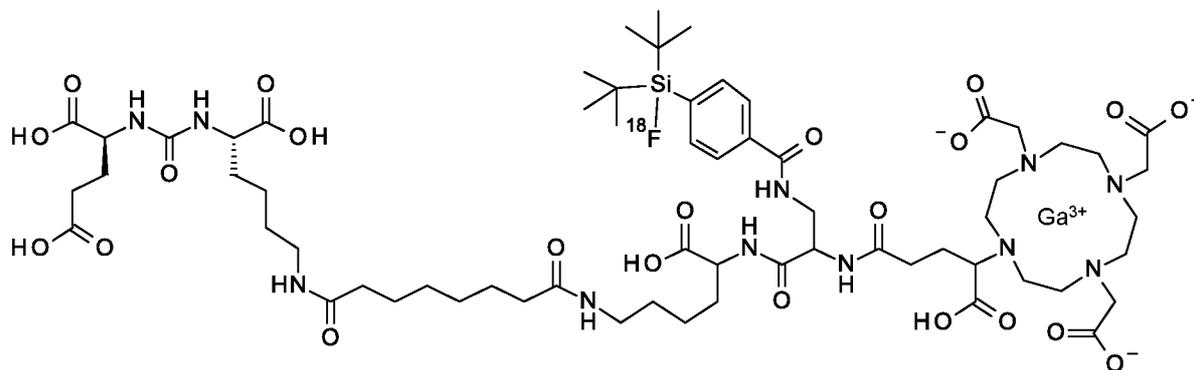
где амидная связь, обозначенная как , образована хелатирующей группой, и линкерной группой формулы:

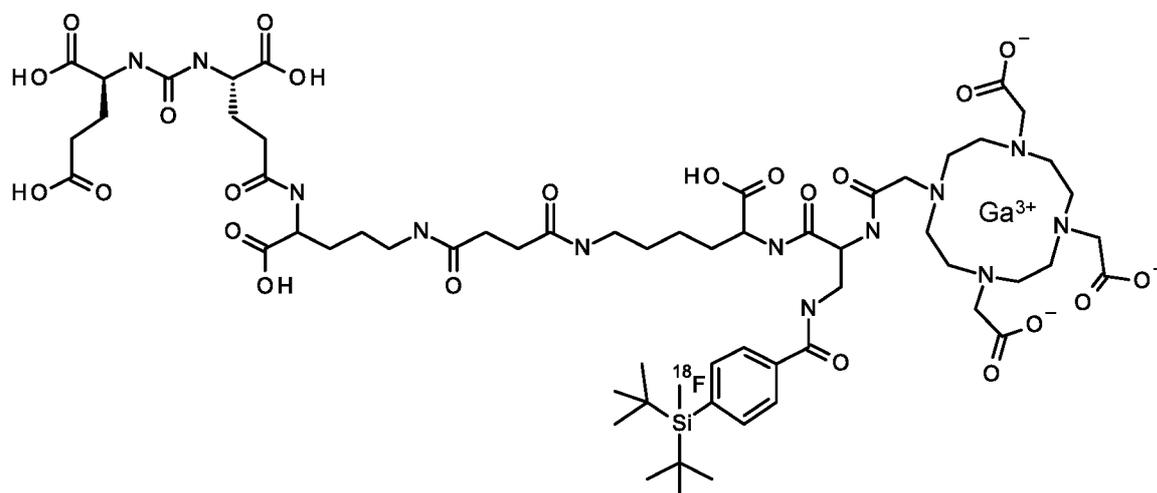
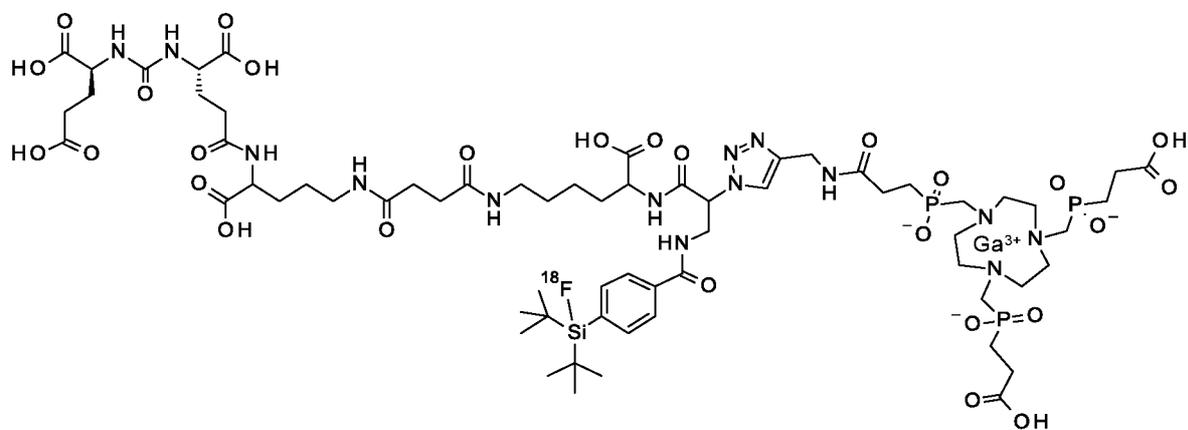
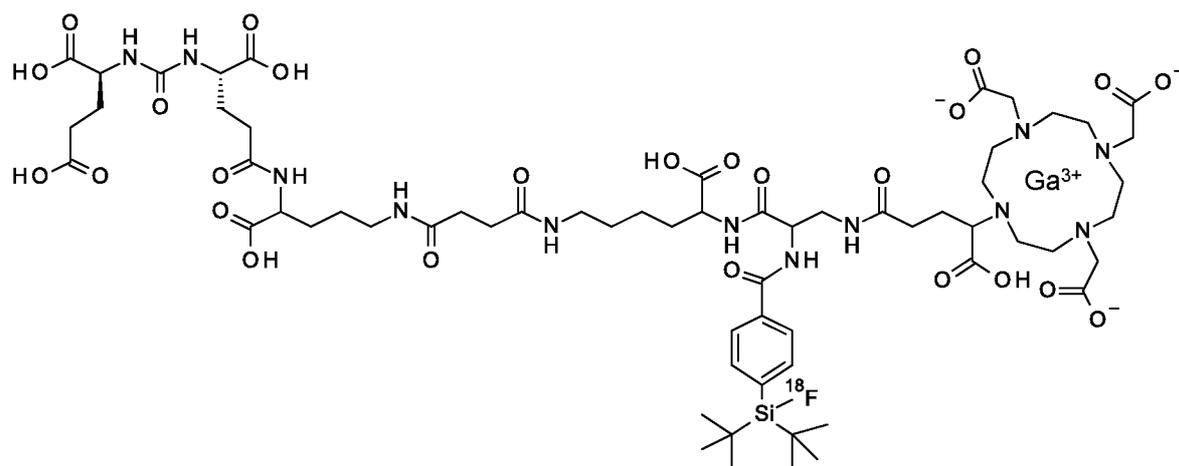
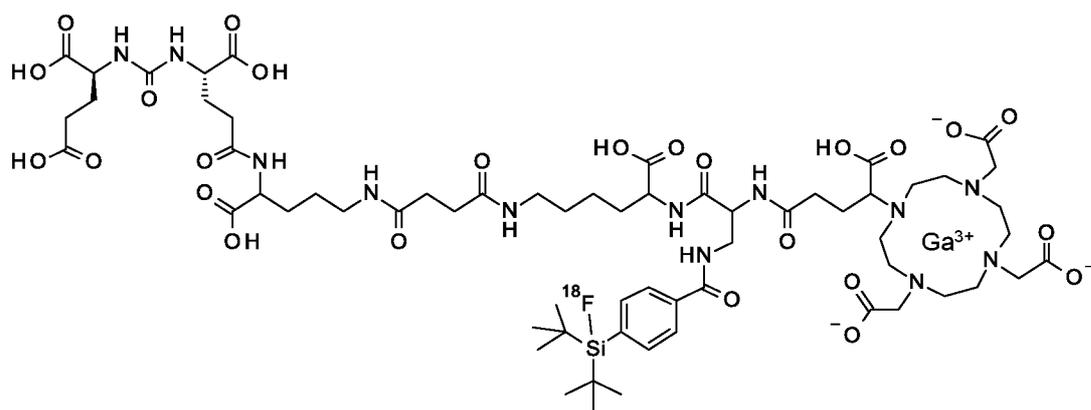


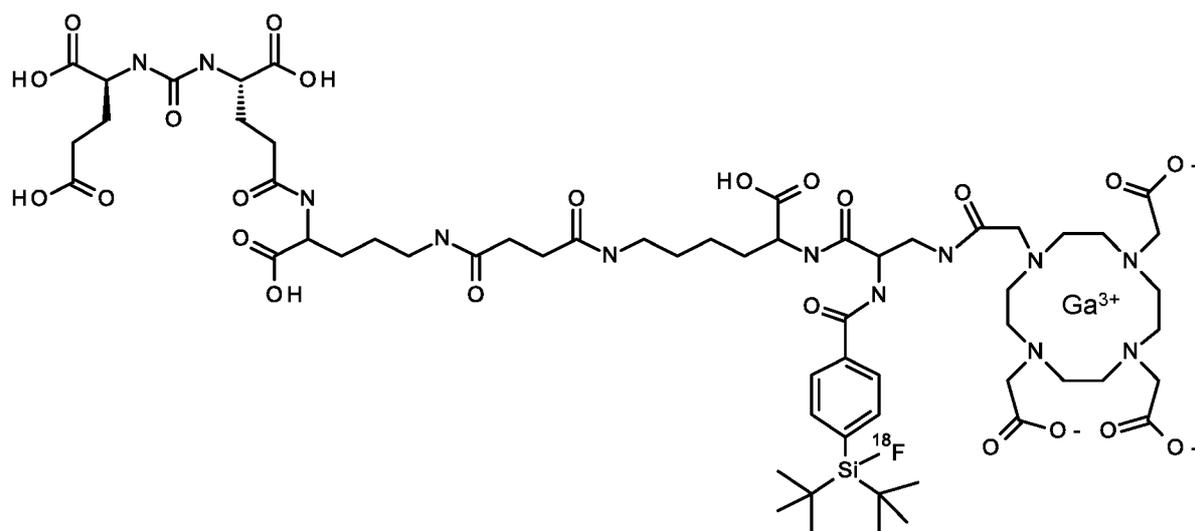
где связь, обозначенная как , на карбонильном конце образована с хелатирующей группой, и

R^{CH} представляет собой хелатирующую группу, содержащую хелатированный нерадиоактивный катион.

14. Конъюгат по любому из пп. 1-13, представляющий собой соединение, выбранное из группы, состоящей из:

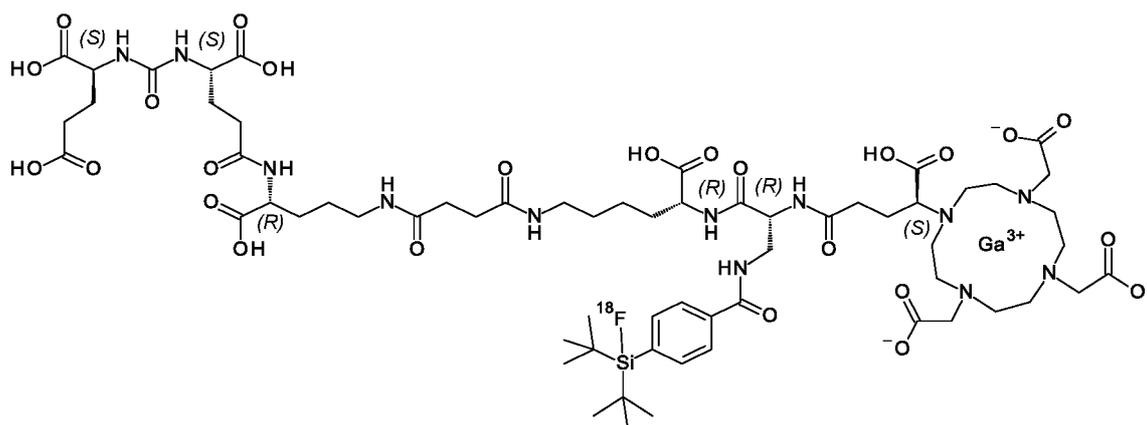






и их фармацевтически приемлемых солей и индивидуальных изомеров, содержащих хелатированный нерадиоактивный катион галлия, и где атом фтора представляет собой ^{18}F .

15. Соединение по п. 14, представляющее собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

16. Фармацевтическая или диагностическая композиция, содержащая или состоящая из одного или более конъюгатов или соединений по любому из пп. 1-15.

17. Конъюгат, соединение или композиция по любому из пп. 1-14 для применения в качестве средства для диагностики или визуализации ракового заболевания.

18. Способ визуализации и/или диагностики рака, включающий введение конъюгата, соединения или композиции по любому из пп. 1-17 пациенту, нуждающемуся в этом.

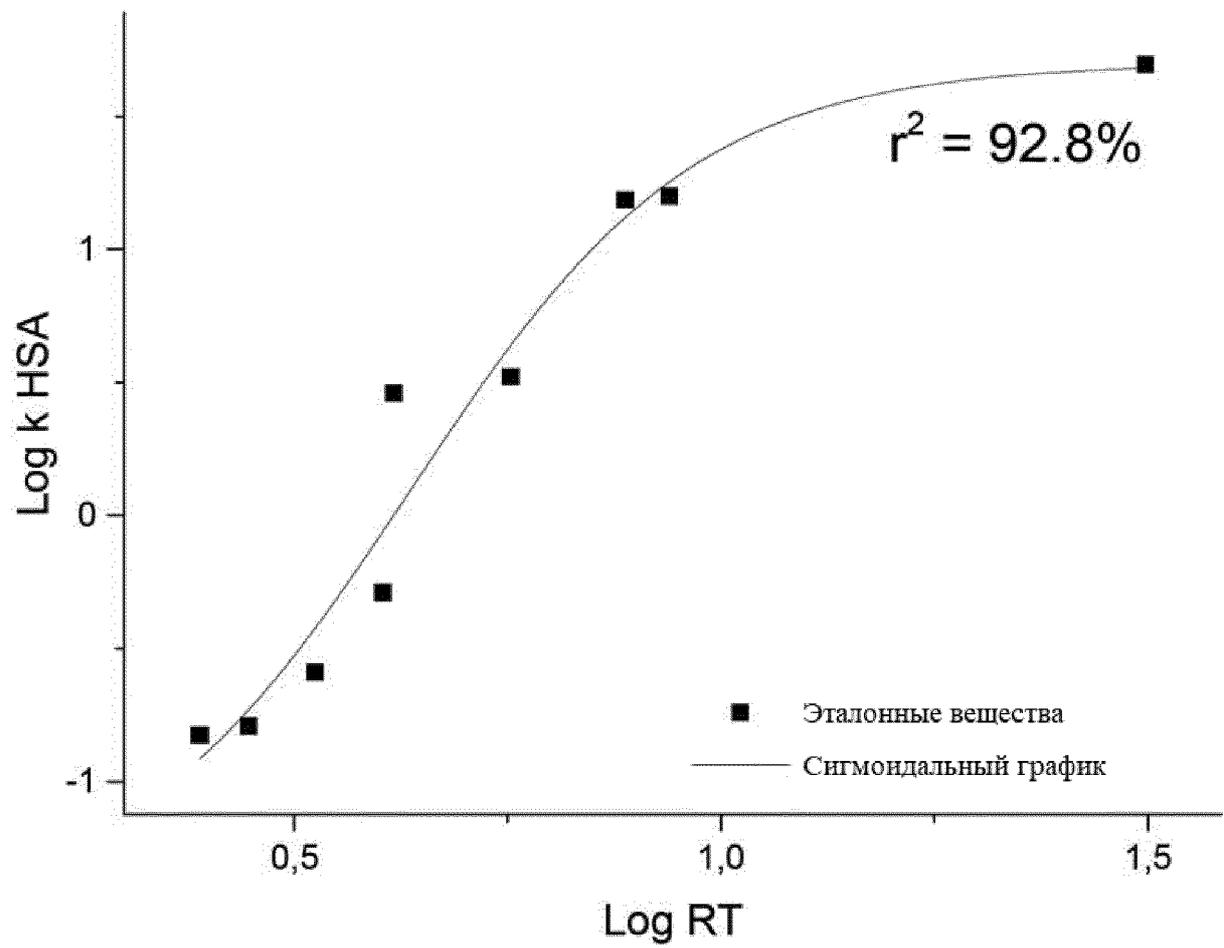
19. Конъюгат, соединение или композиция по любому из пп. 1-16 для применения для лечения ракового заболевания.

20. Конъюгат, соединение или композиция по любому из пп. 1-17 для диагностики, визуализации или предотвращения неангиогенеза/ангиогенеза.

21. Конъюгат, соединение или композиция по любому из пп. 1-17 для применения в качестве средства диагностики или визуализации ракового заболевания, или для применения для визуализации ракового заболевания, где раковое заболевание представляет собой карциному предстательной железы, молочной железы, легкого, колоректальную или почечно-клеточную карциному.

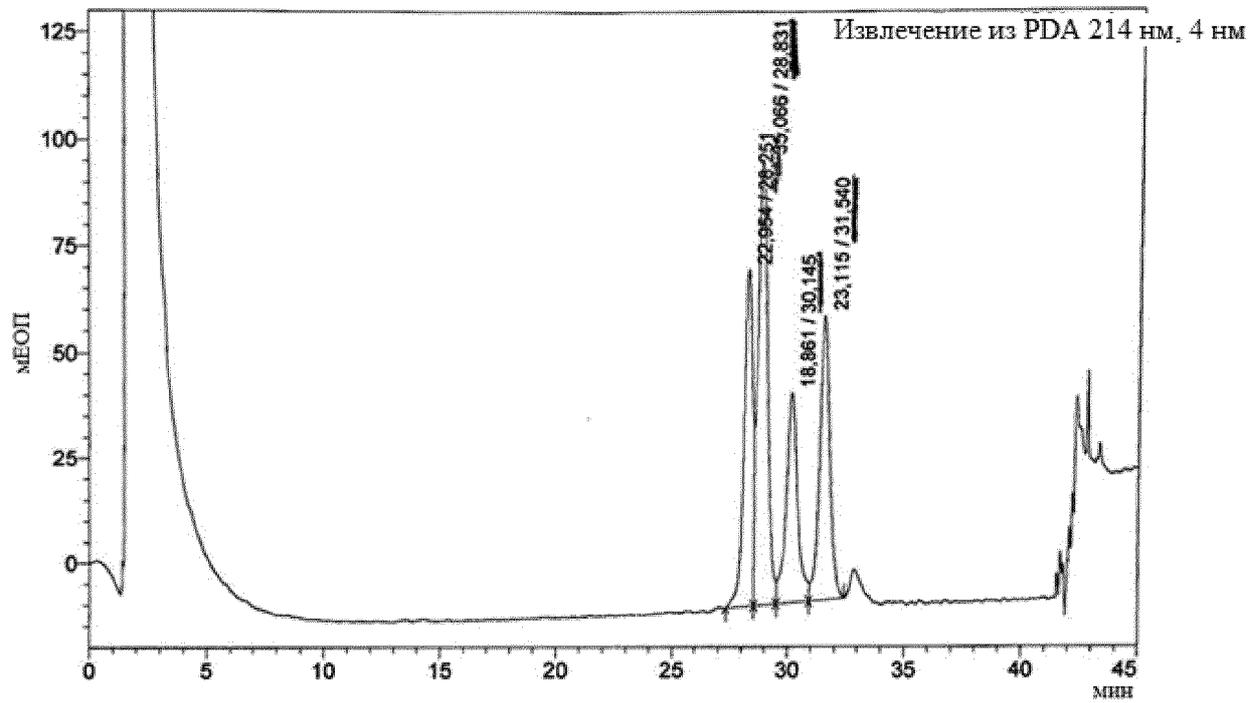
СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ
РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

Фиг. 1

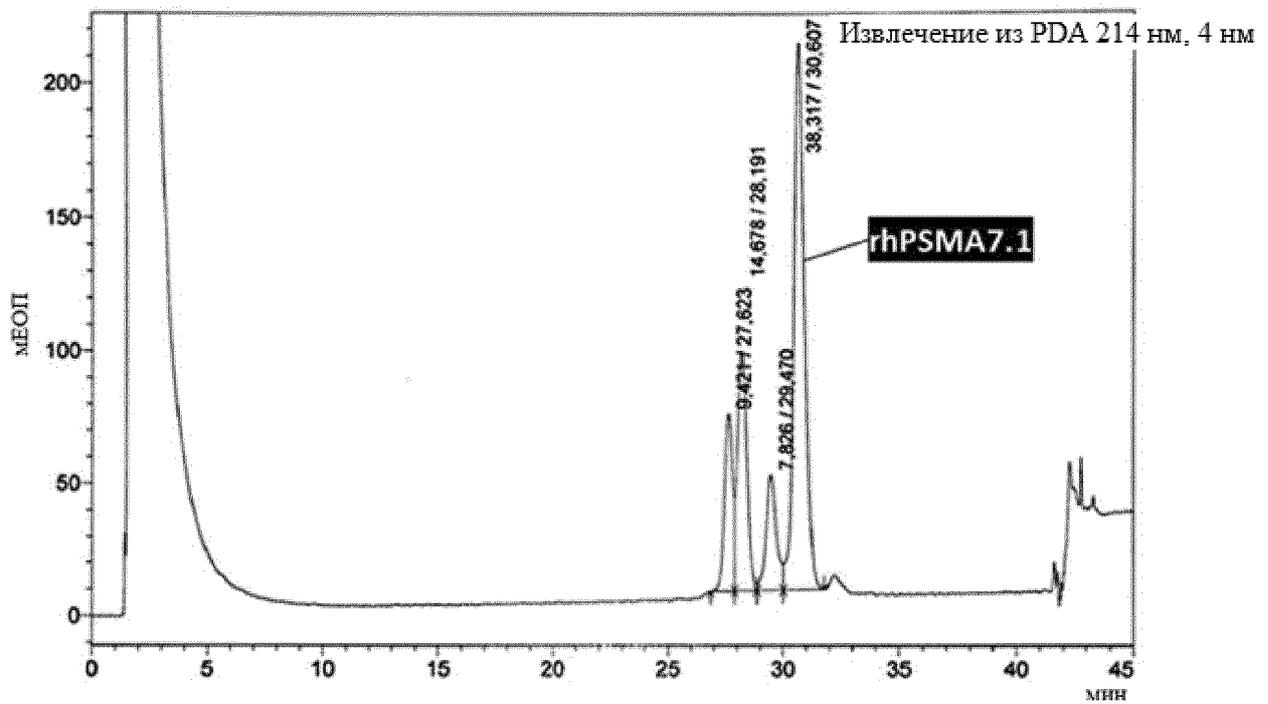


СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ
РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

Фиг. 2а

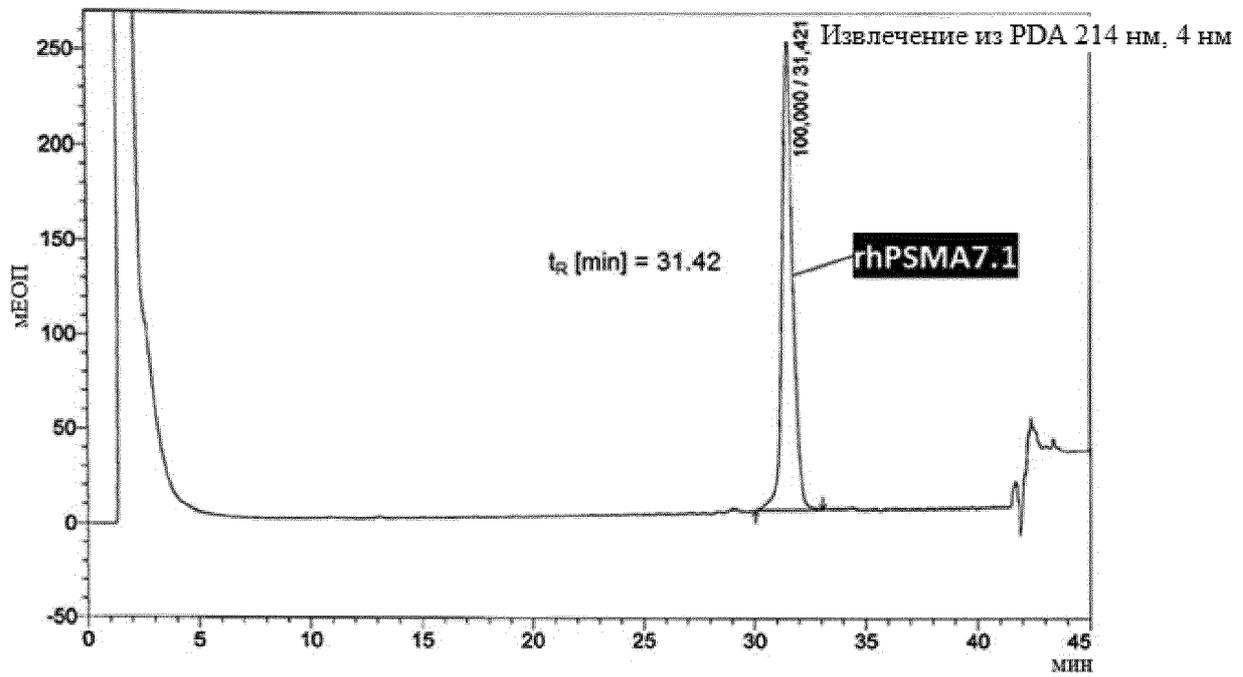


Фиг. 2b

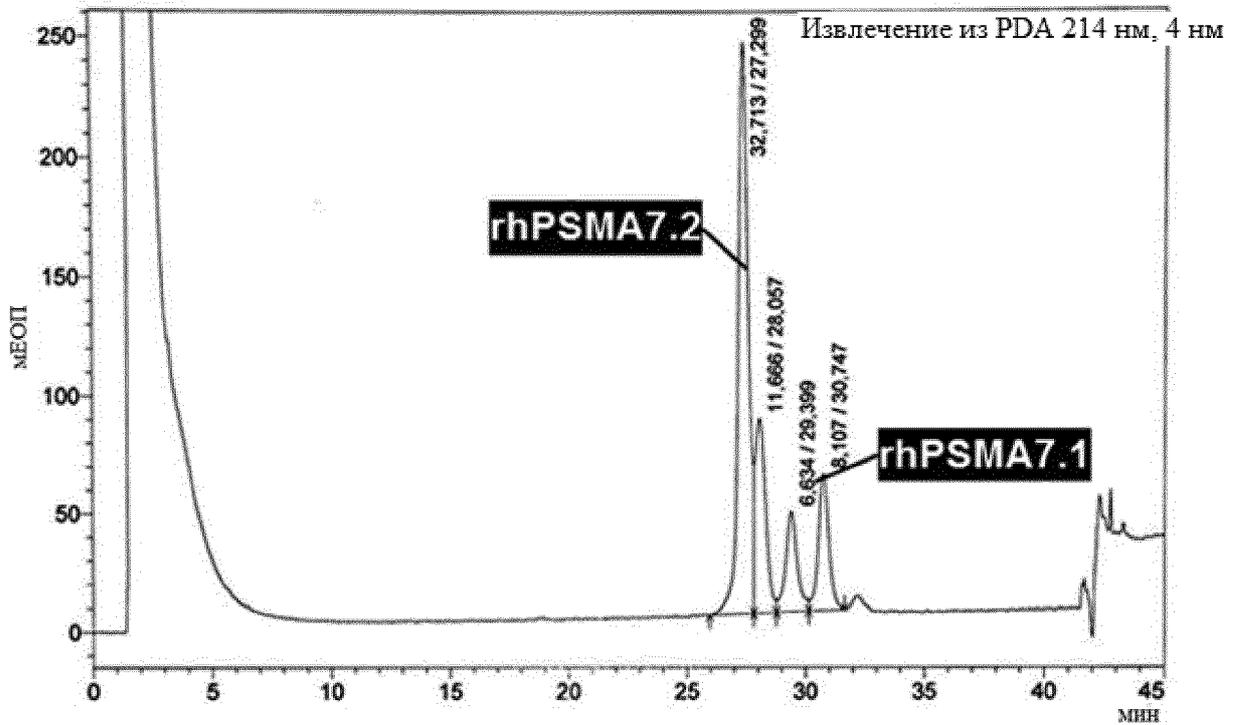


СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ
РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

Фиг. 2с

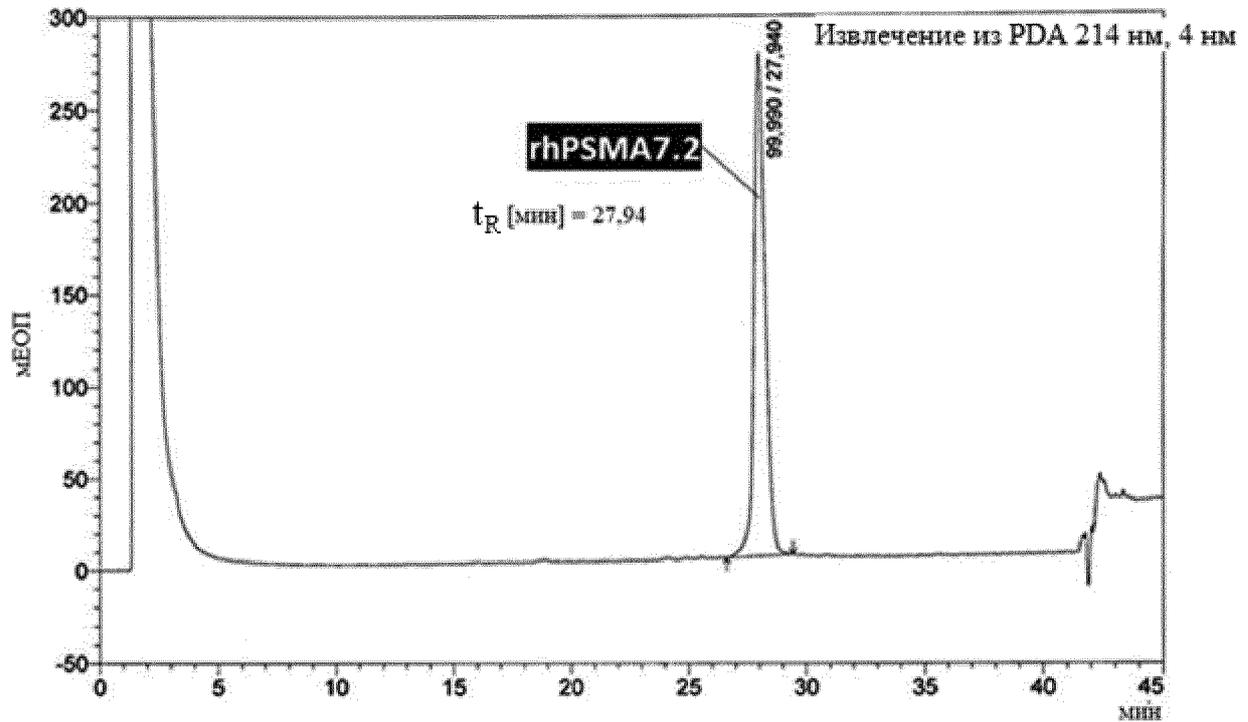


Фиг. 3а

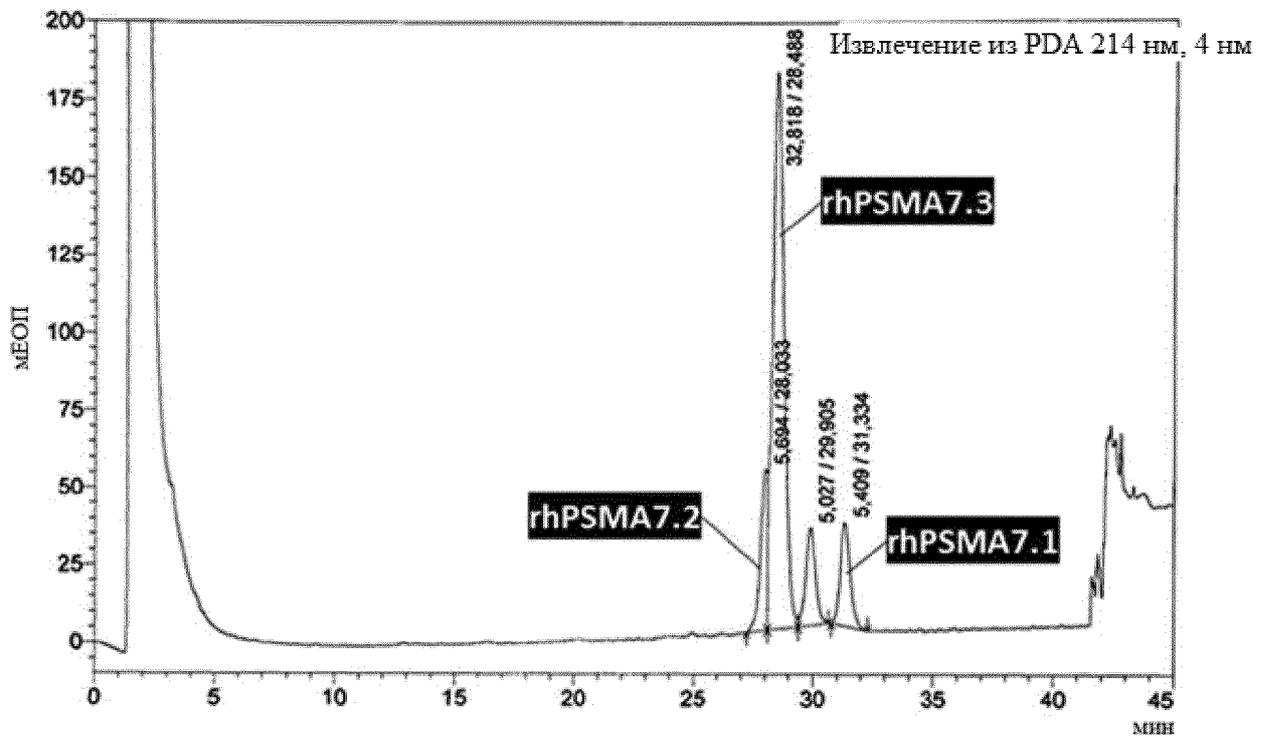


СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ
РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

Фиг. 3b

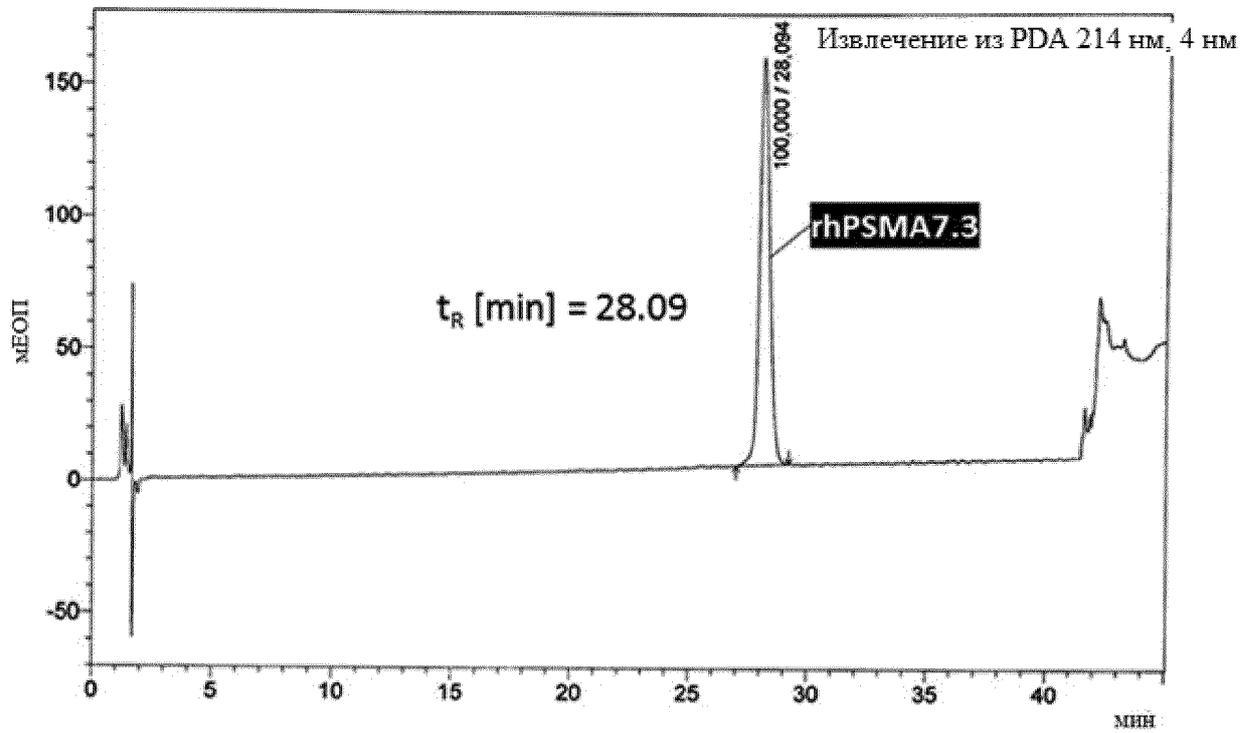


Фиг. 4а

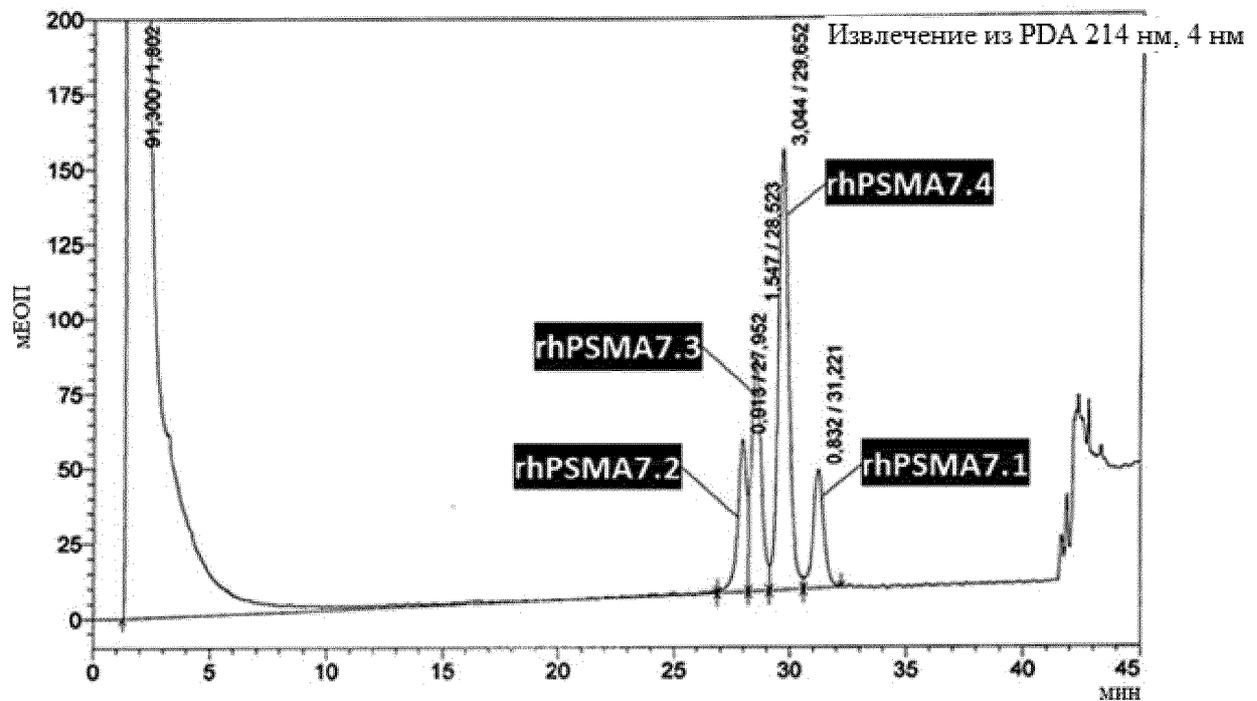


СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ
РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

Фиг. 4b

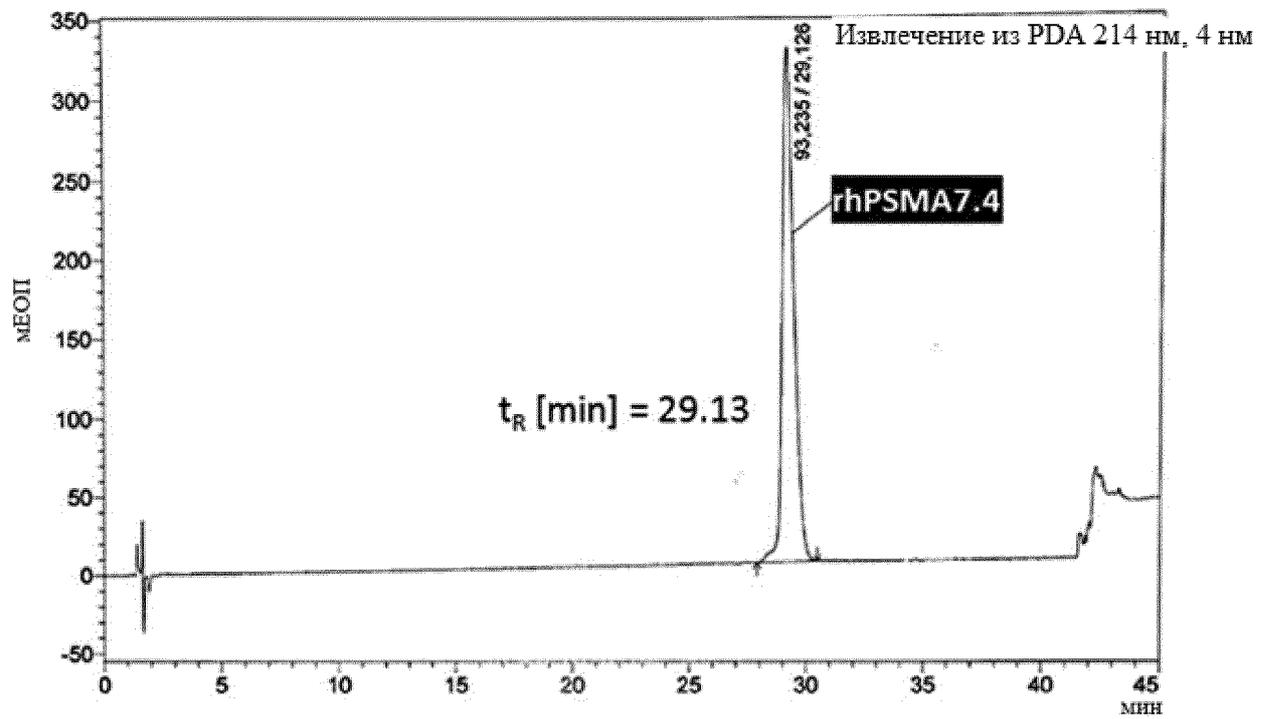


Фиг. 5а

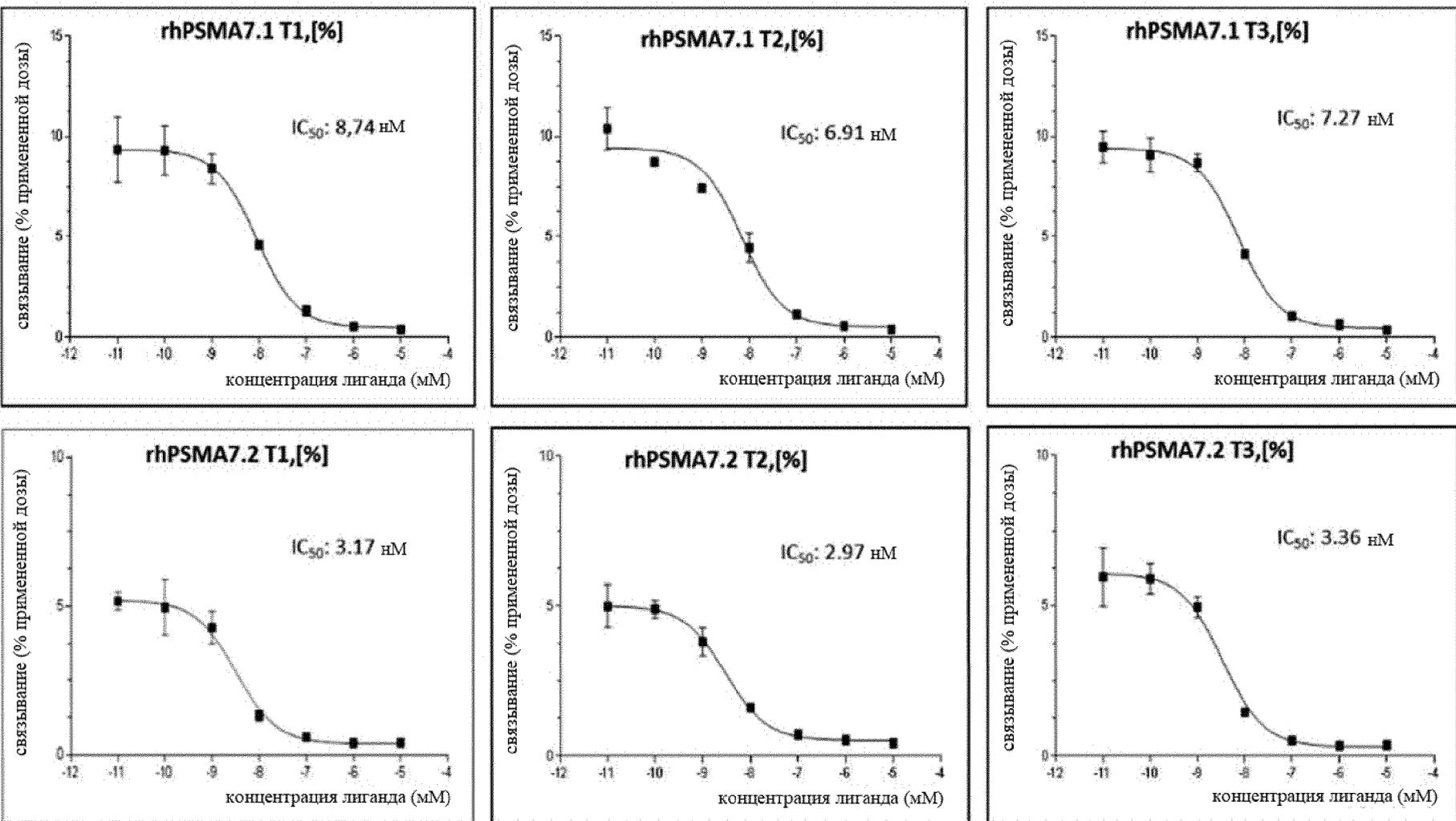


СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ
РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

Фиг. 5b

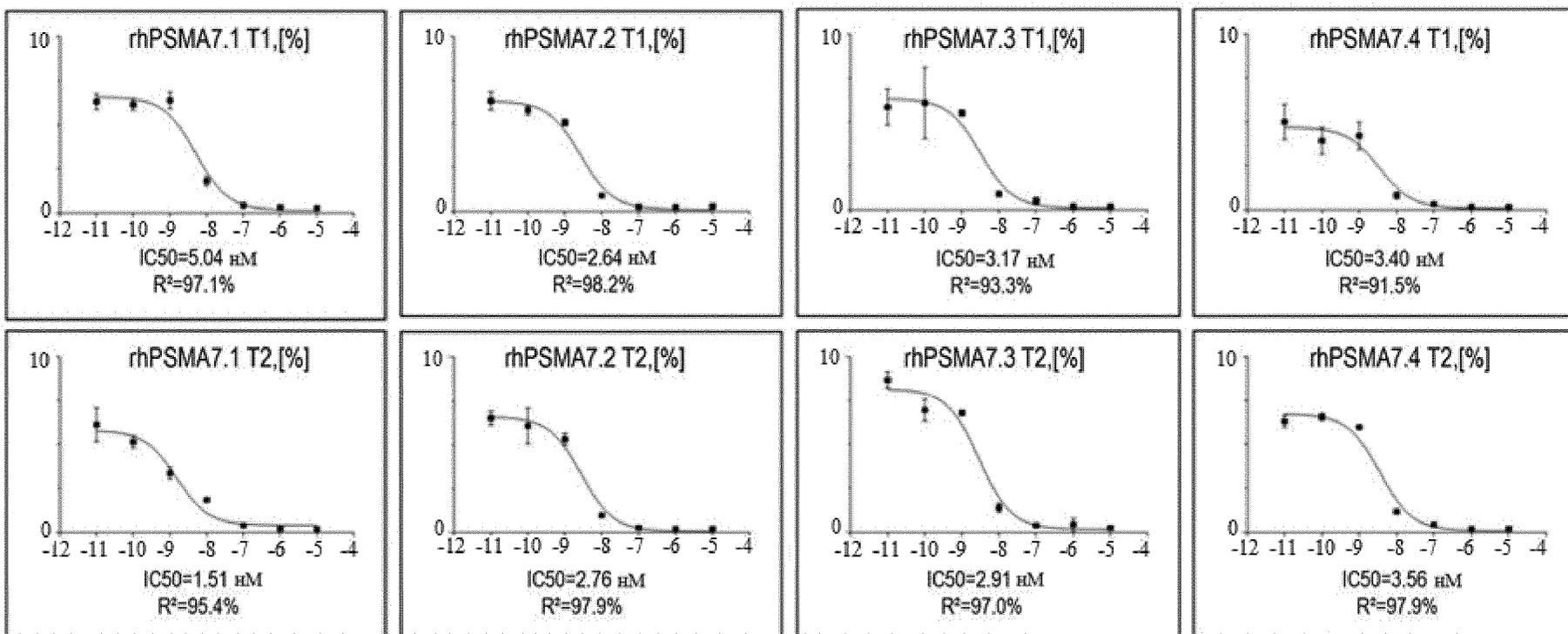


Фиг. 6а



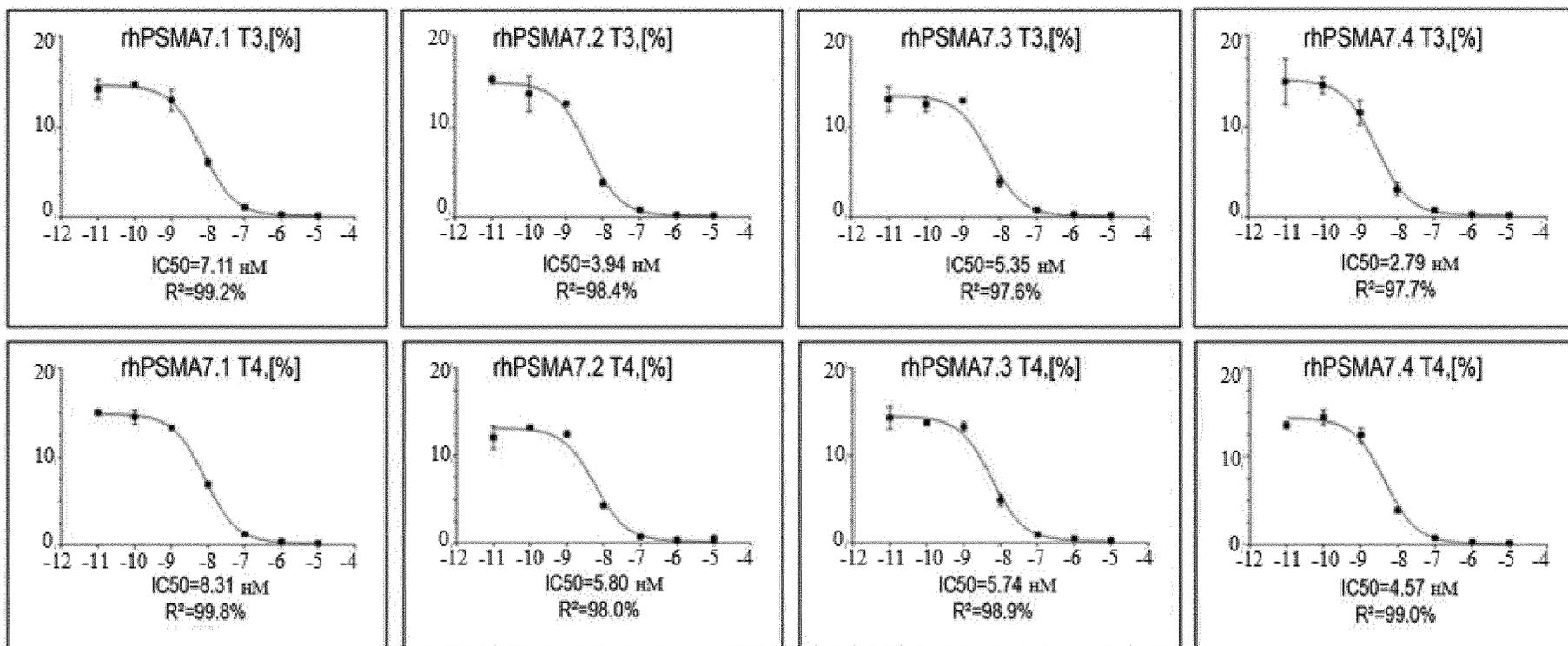
Фиг. 6b

Ось X - концентрация конкуретного вещества [10^X M]
Ось Y - связывание [% примененной дозы]



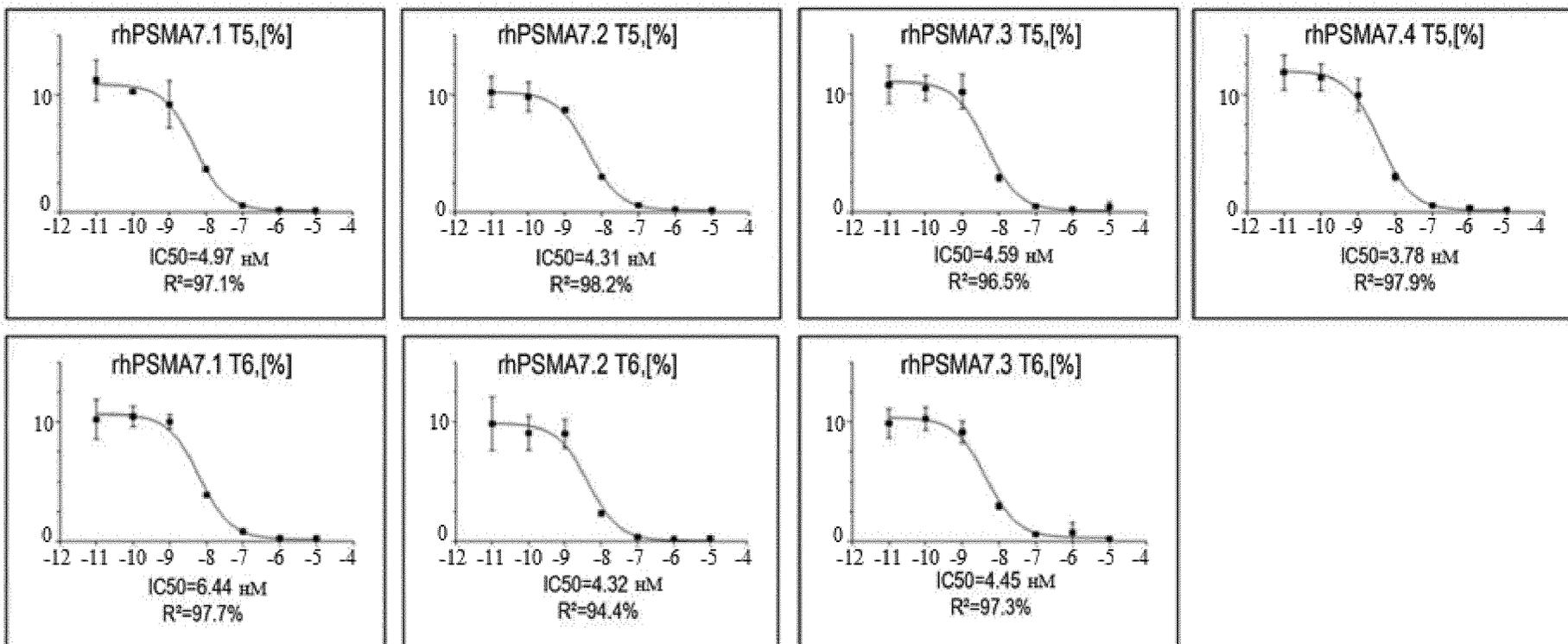
Фиг. 6b (продолжение)

Ось X - концентрация конкурентного вещества [10^X M]
Ось Y - связывание [% примененной дозы]



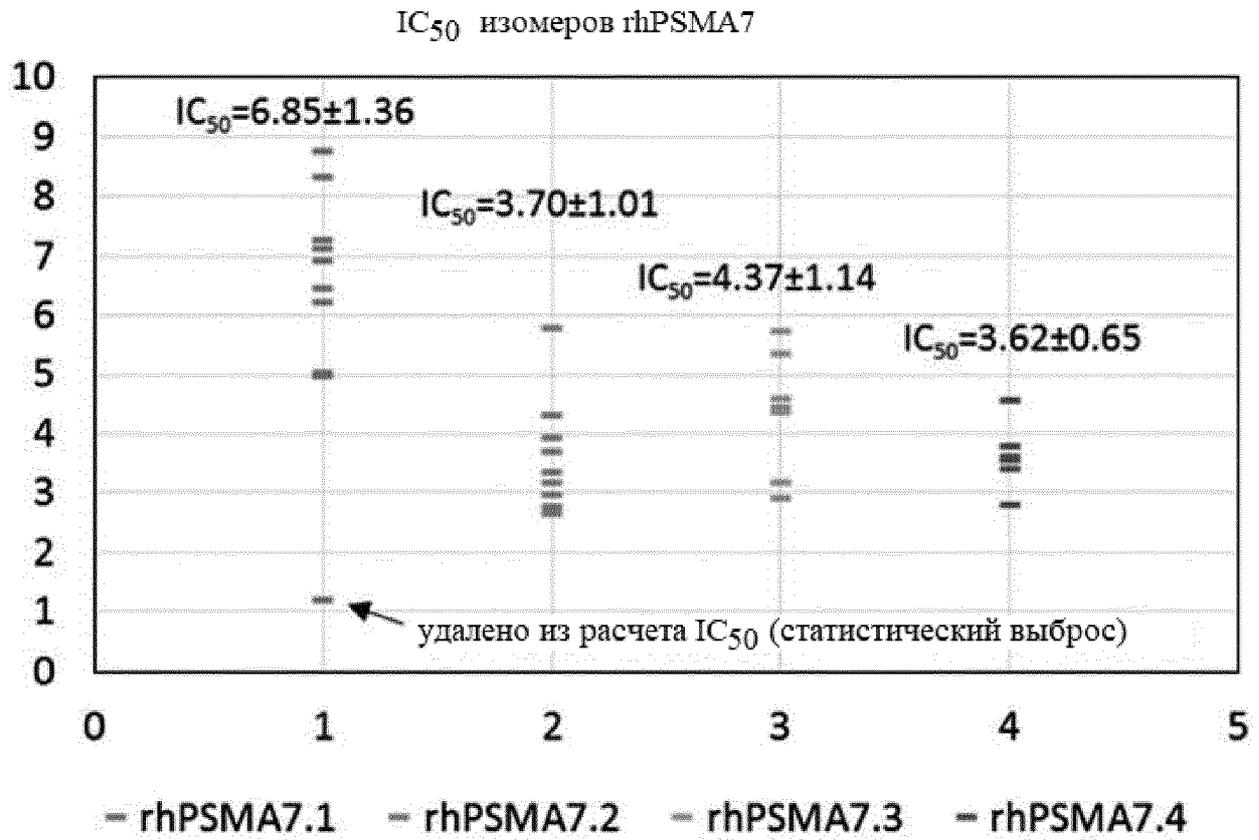
Фиг. 6b (продолжение)

Ось X - концентрация конкуретного вещества [10^X M]
Ось Y - связывание [% примененной дозы]



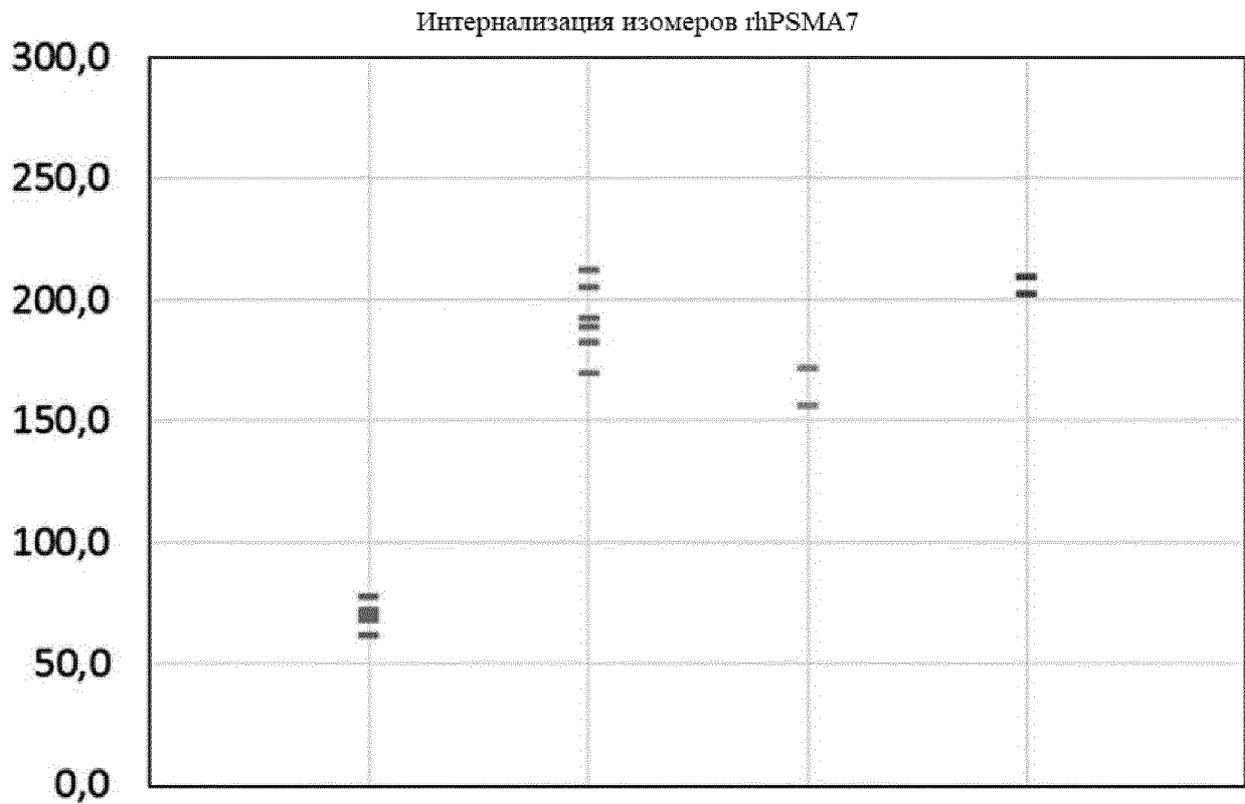
СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ
РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

Фиг. 7

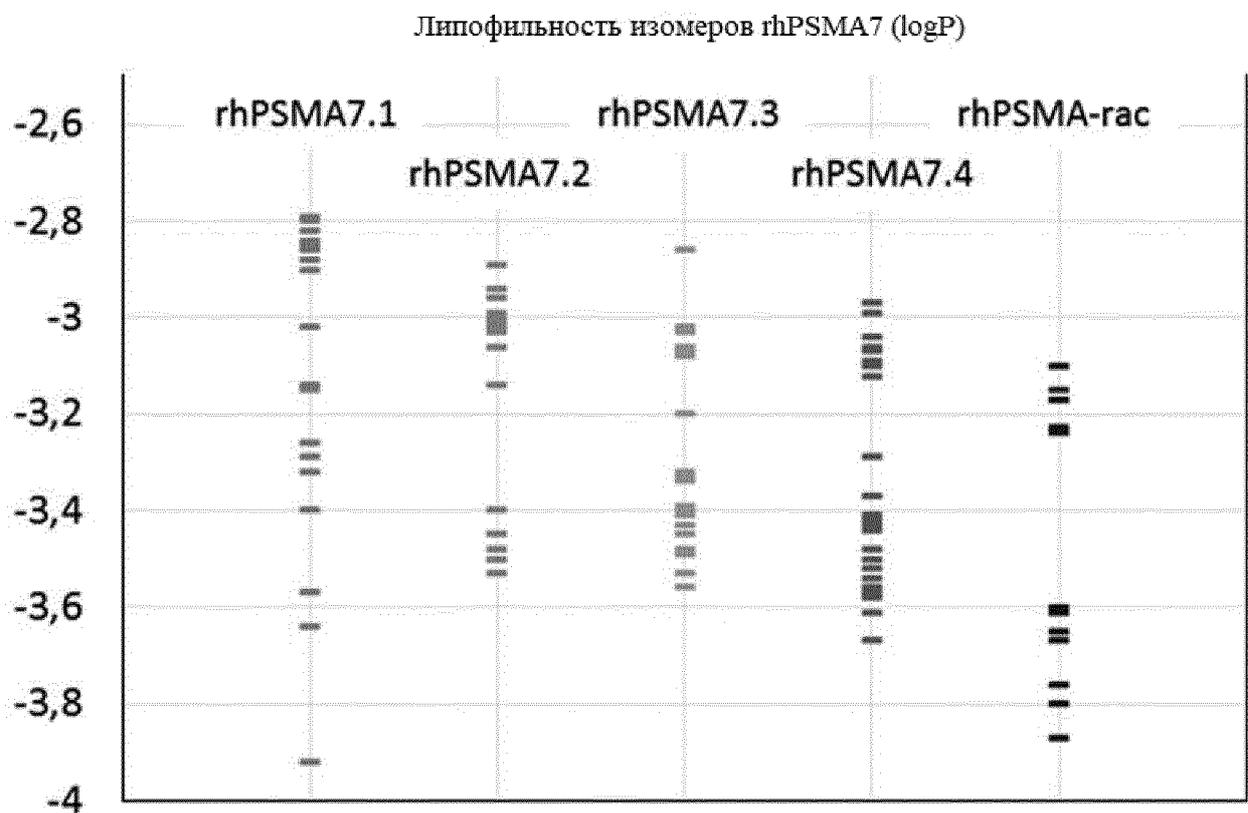


СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ
РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

Фиг. 8

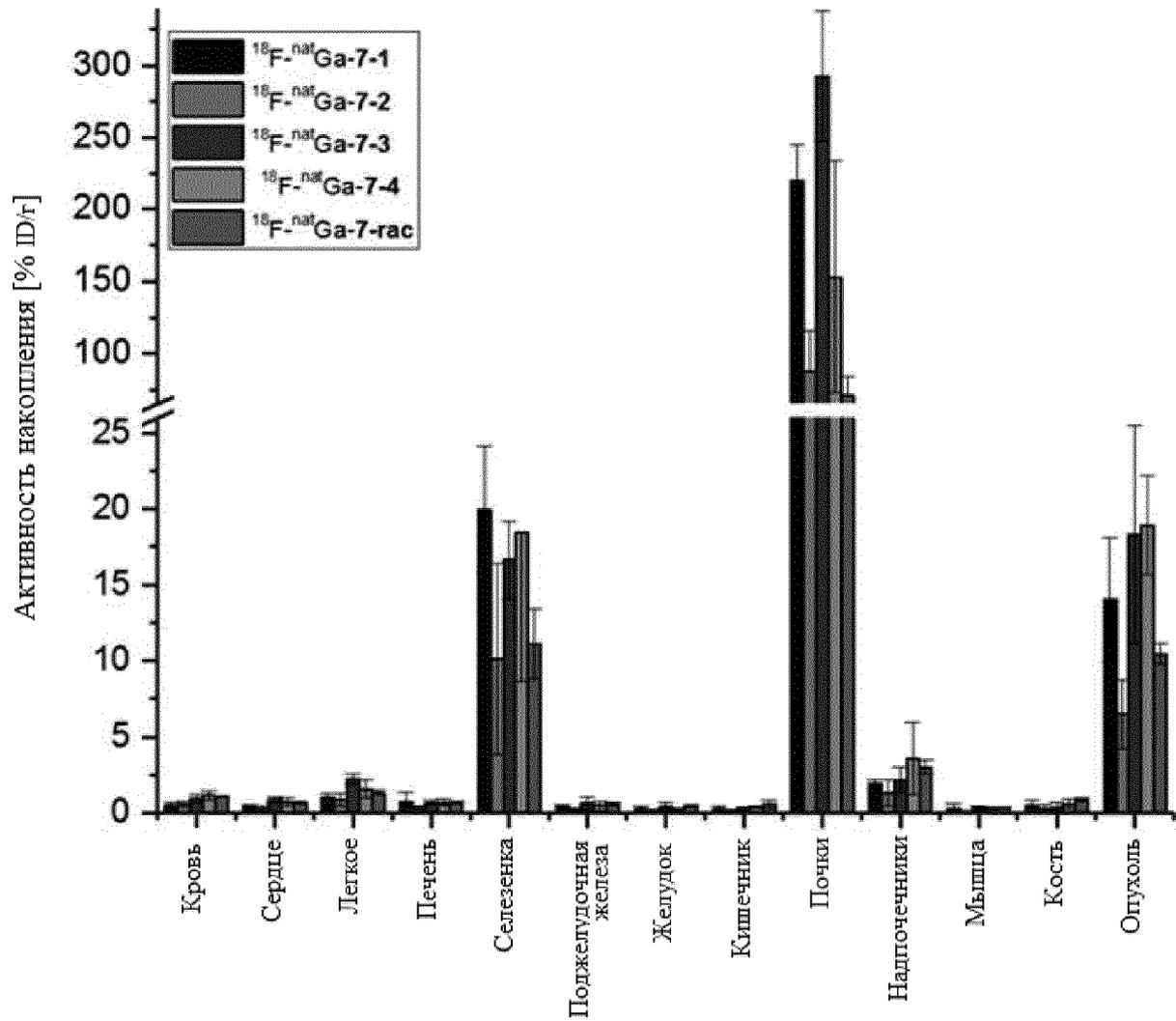


Фиг. 9



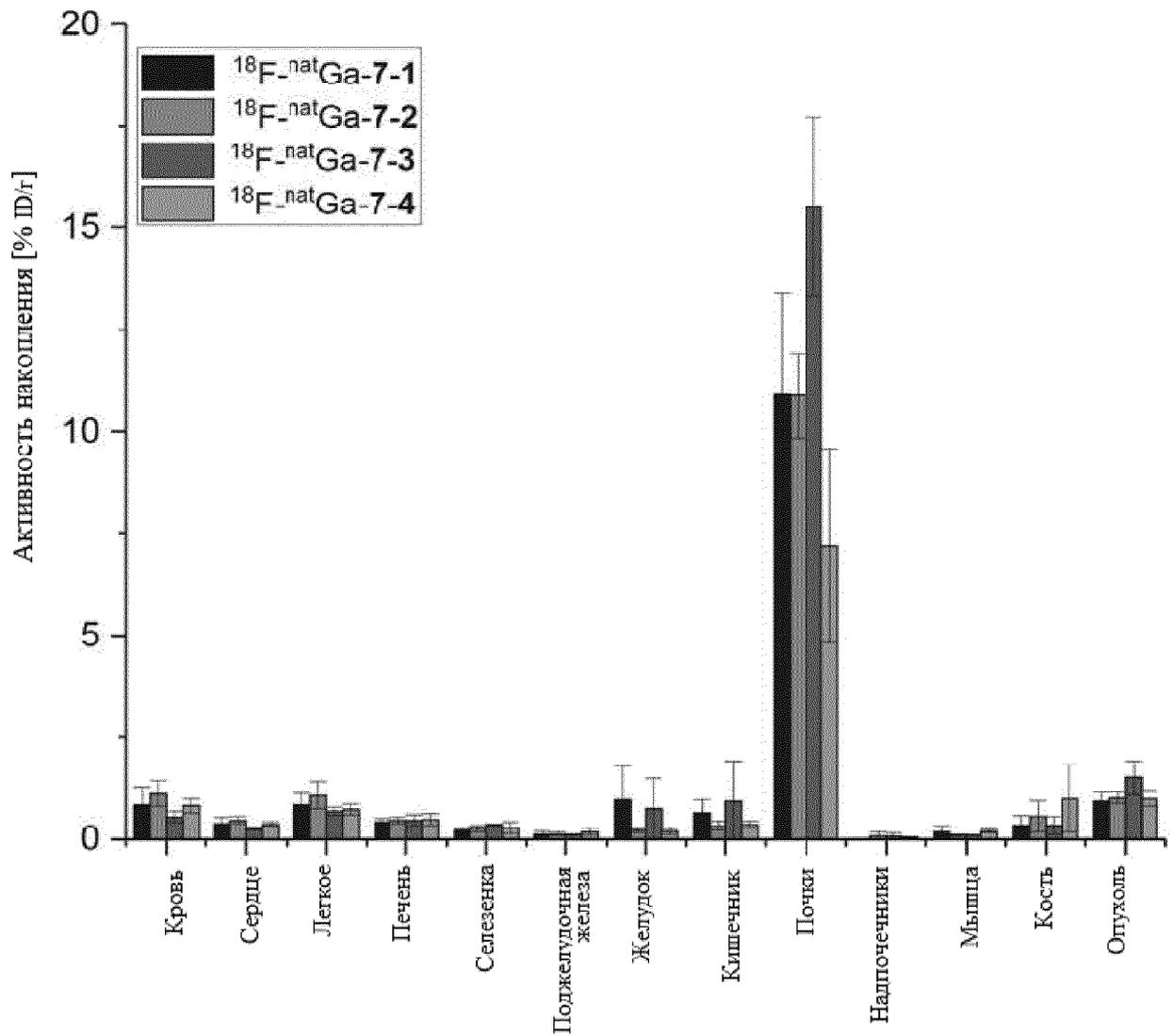
СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ
РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

Фиг. 10

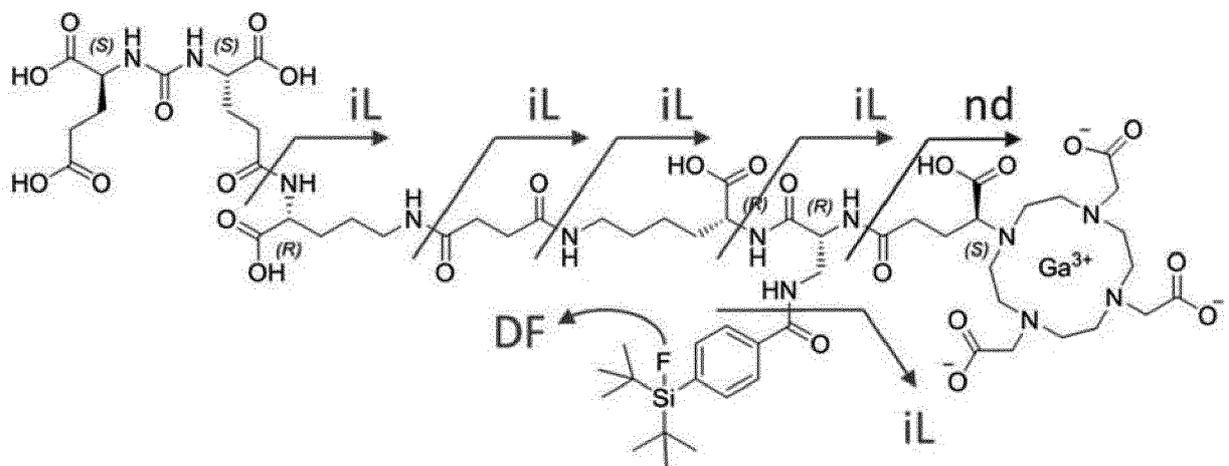


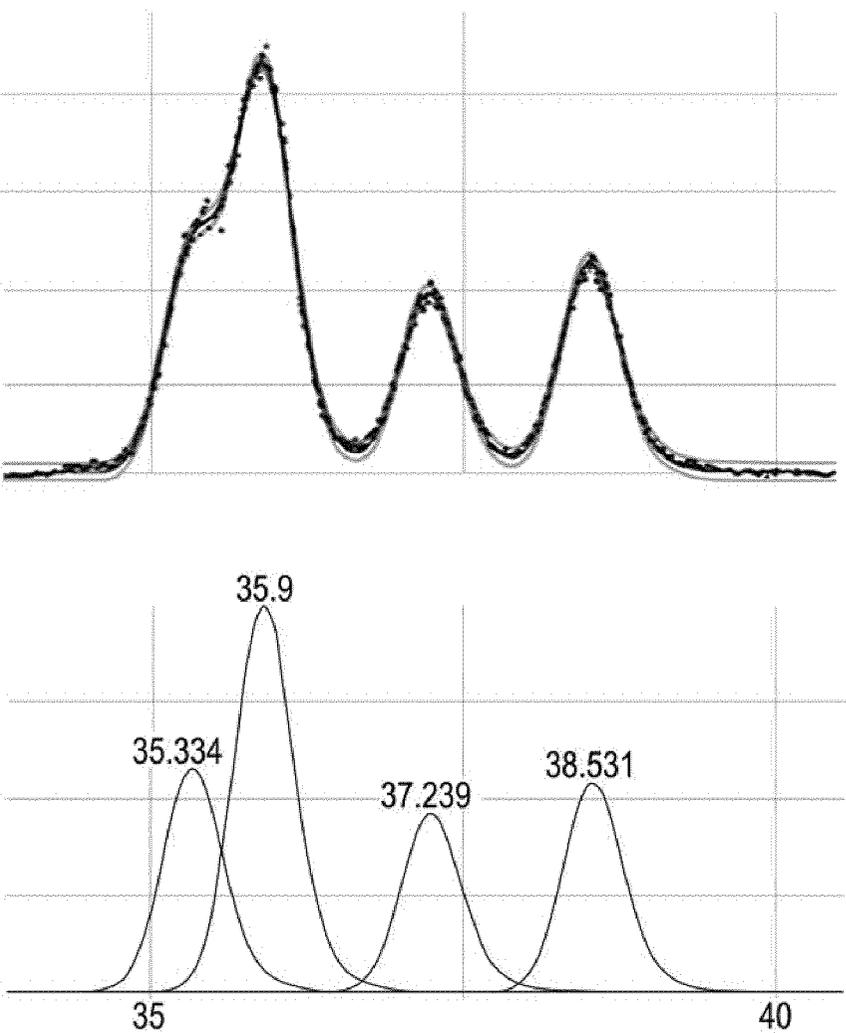
СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ
РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

Фиг. 11

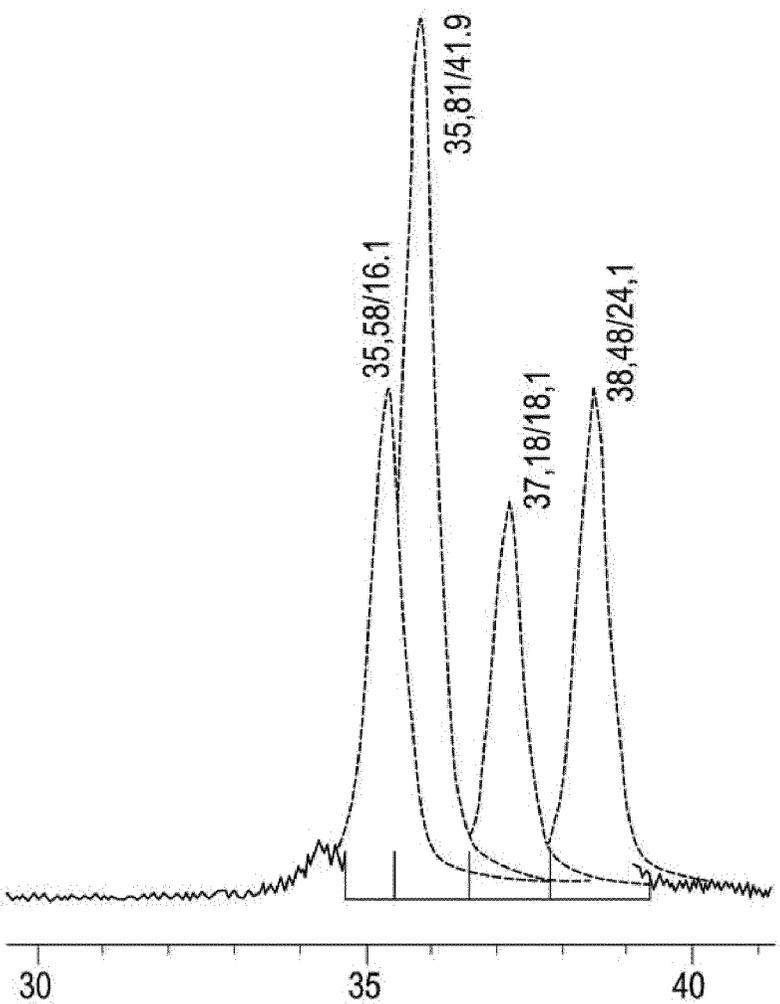


Фиг. 12

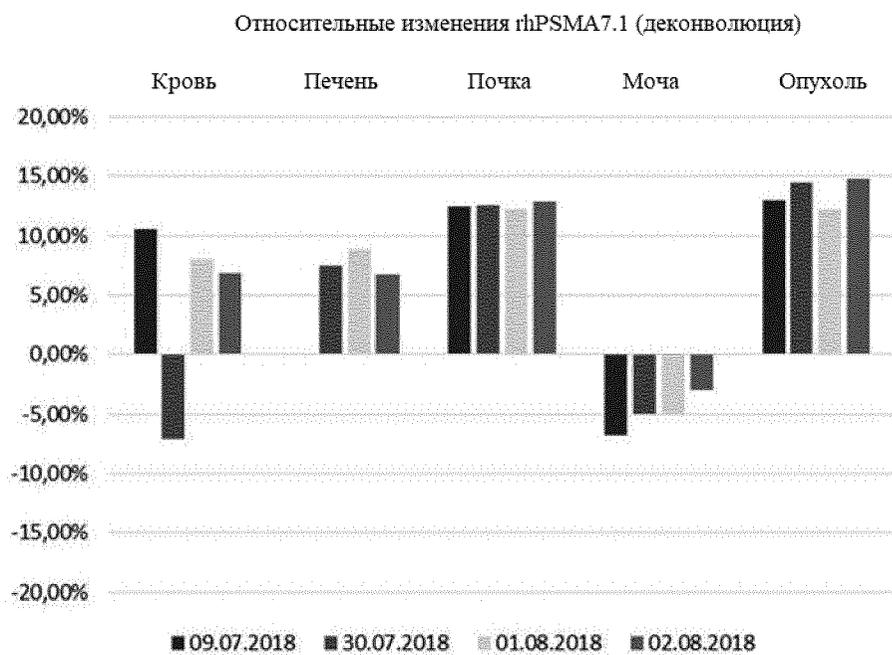
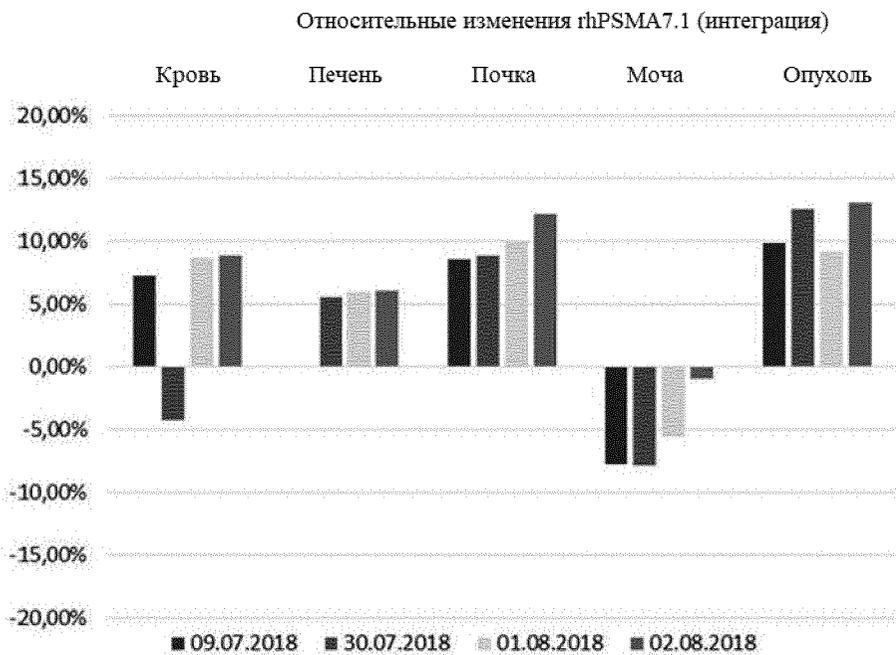




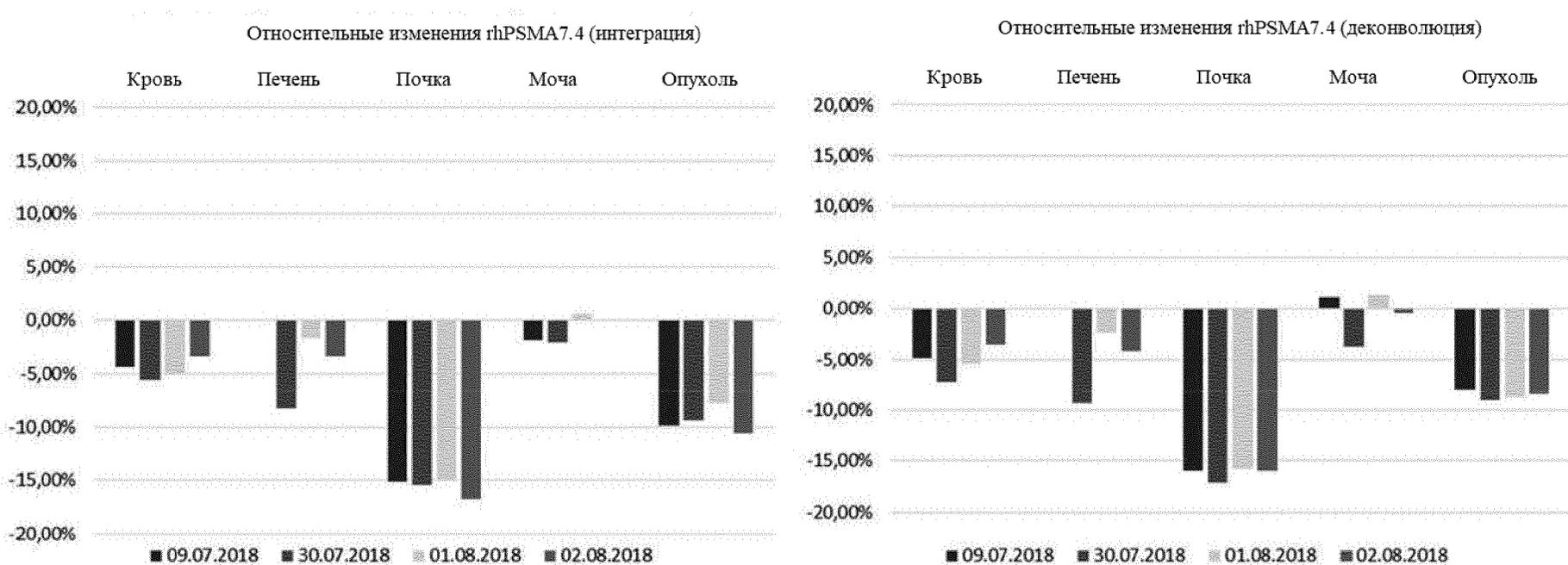
Фиг. 13



Фиг. 14а

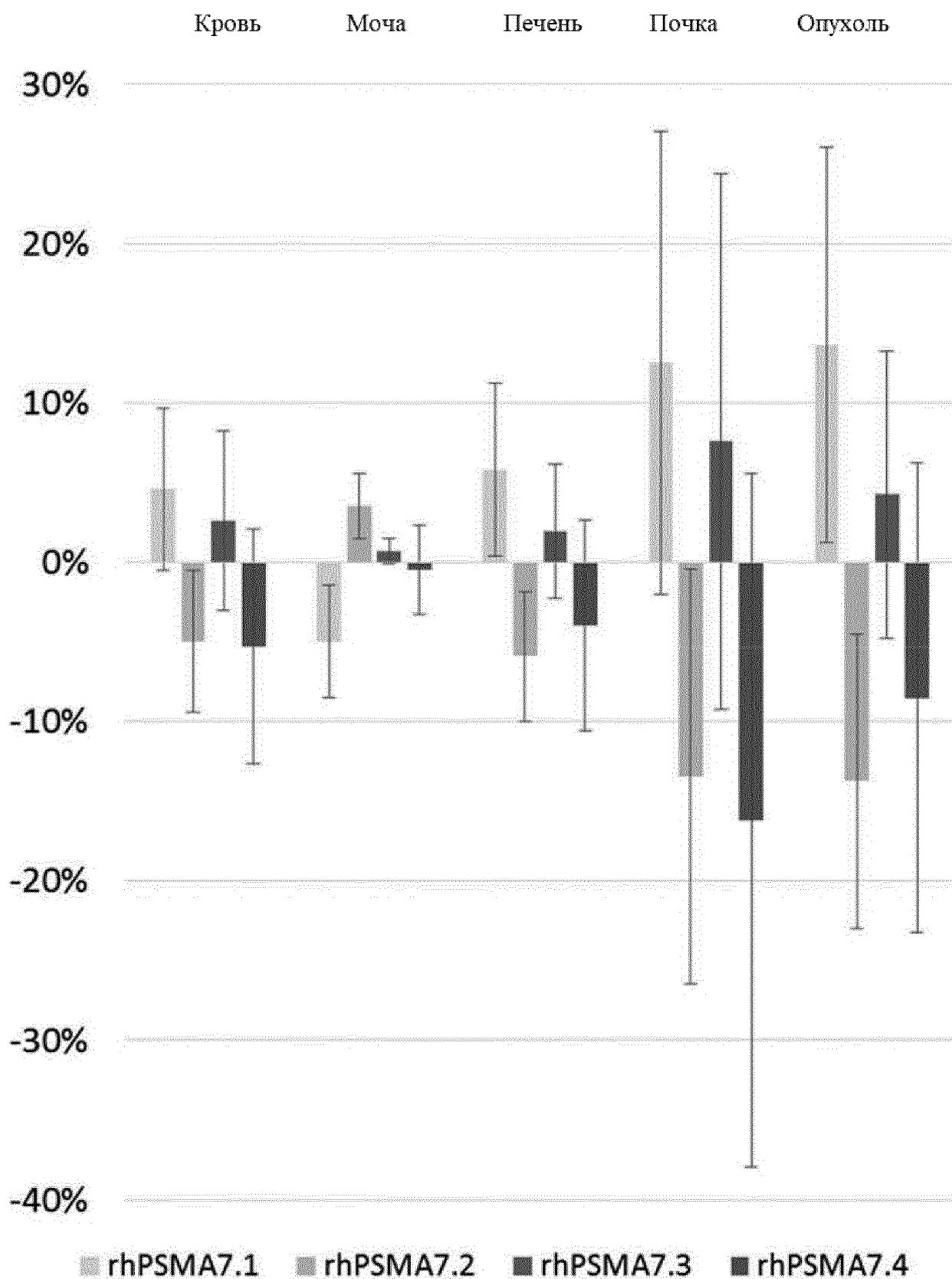


Фиг. 14b



СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ
РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

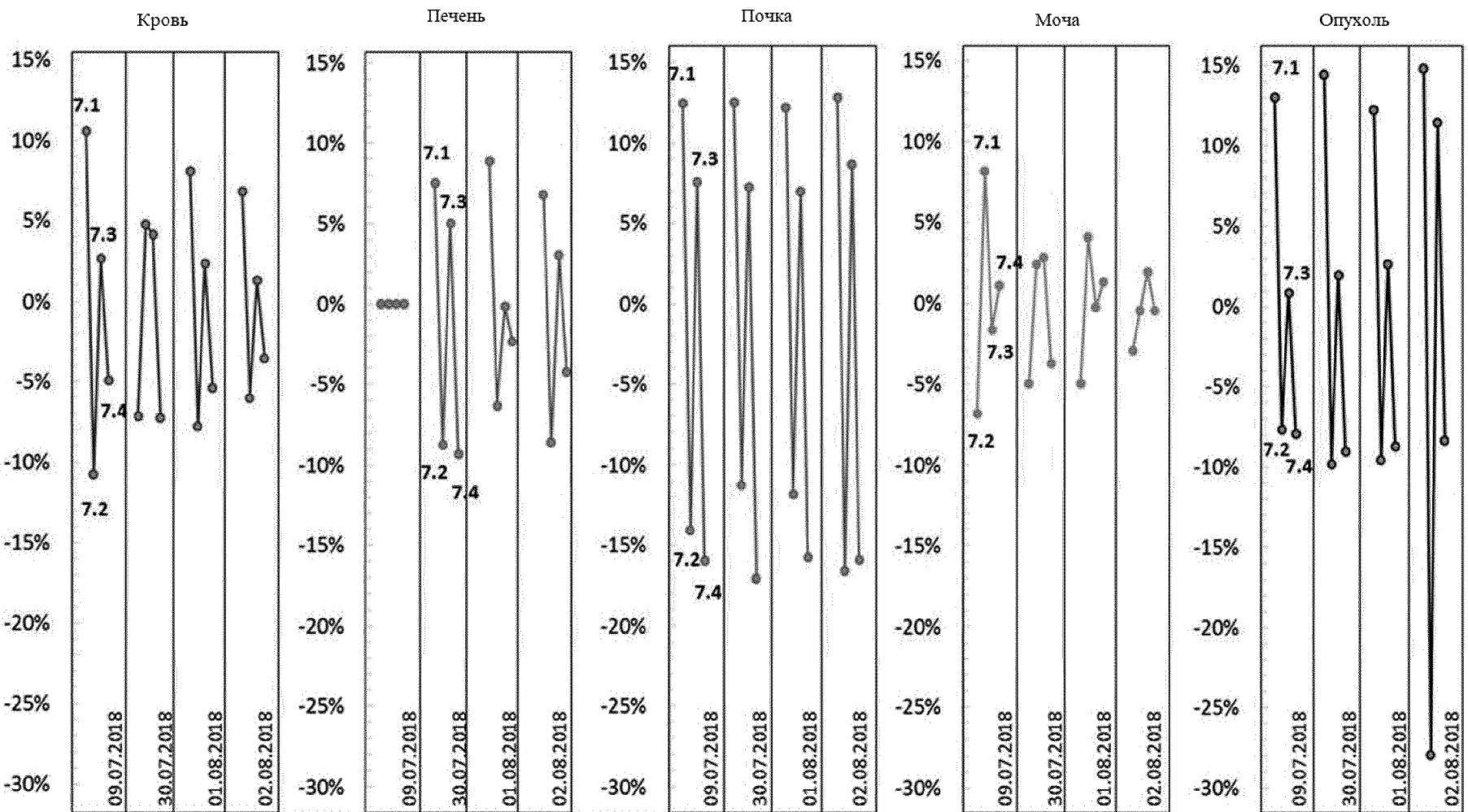
Фиг. 15



СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

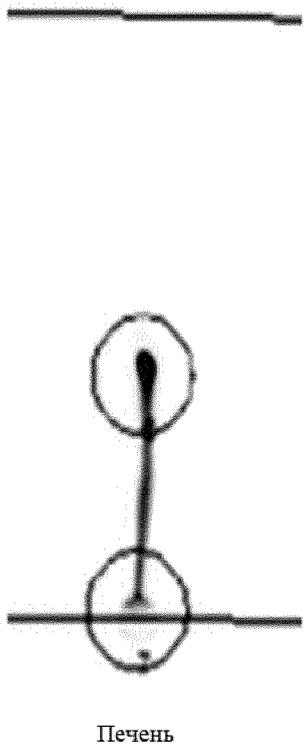
РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

Фиг. 16

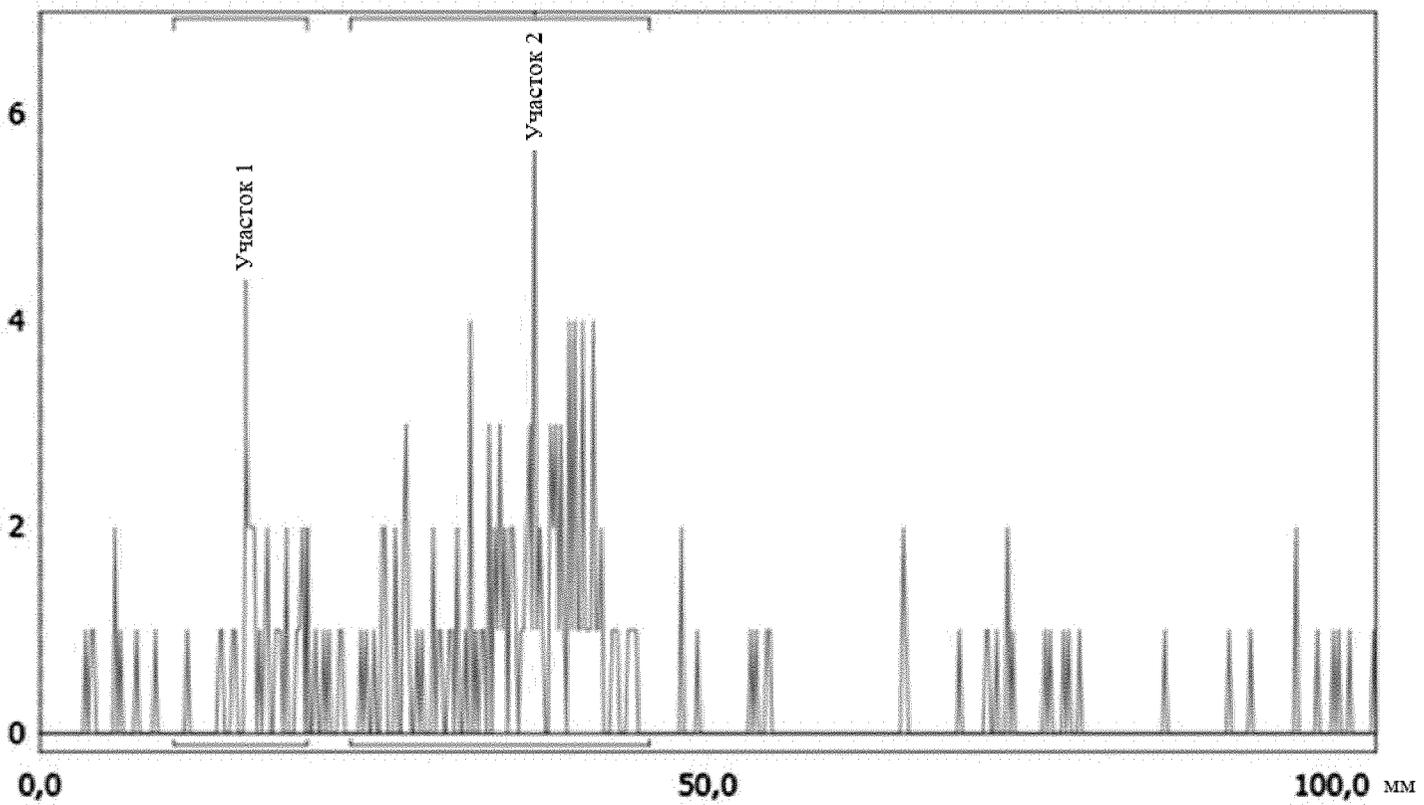


СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

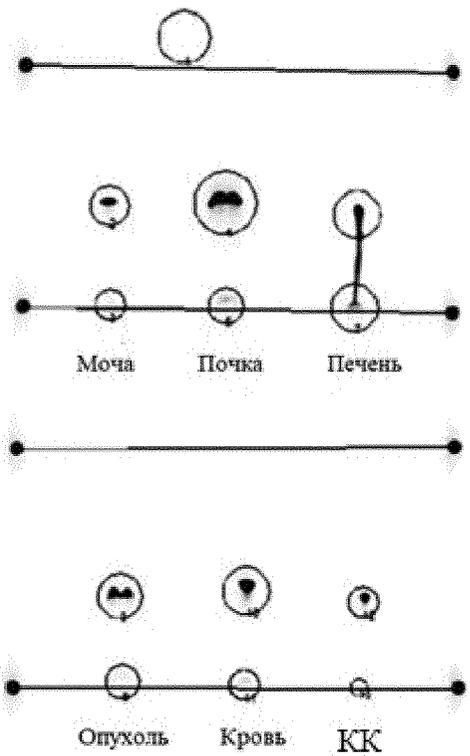


Фиг. 17

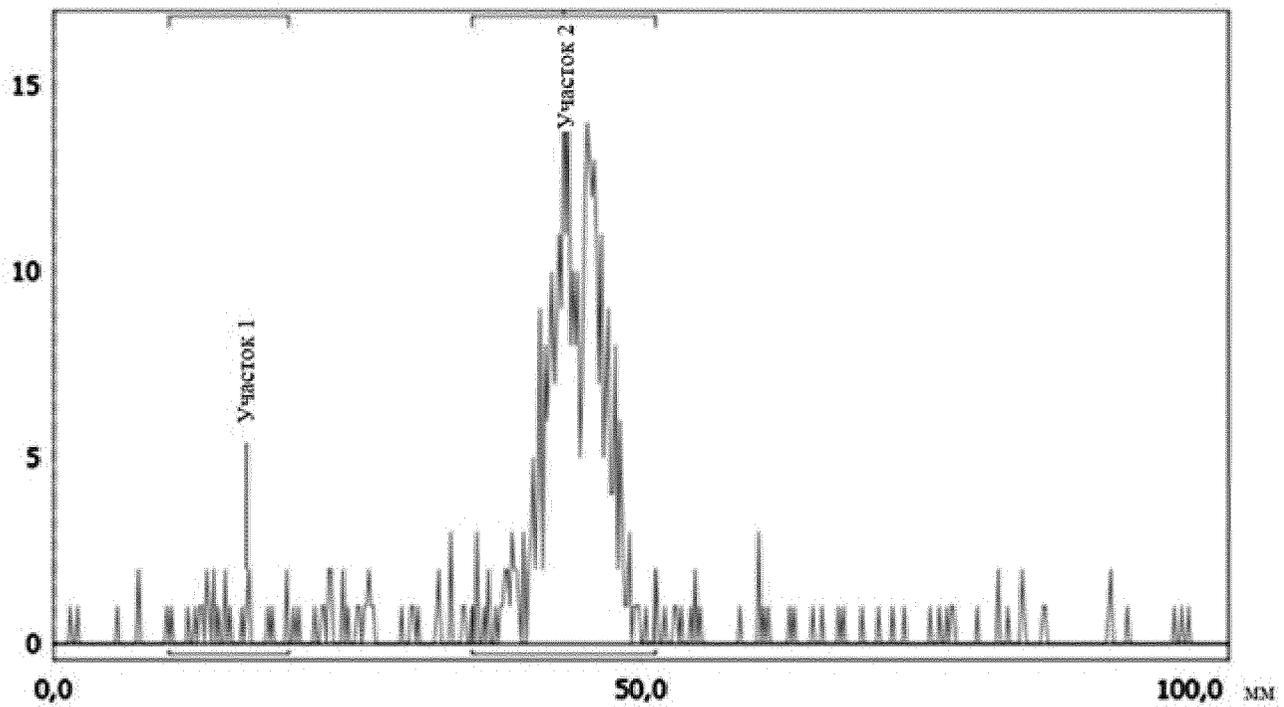


СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

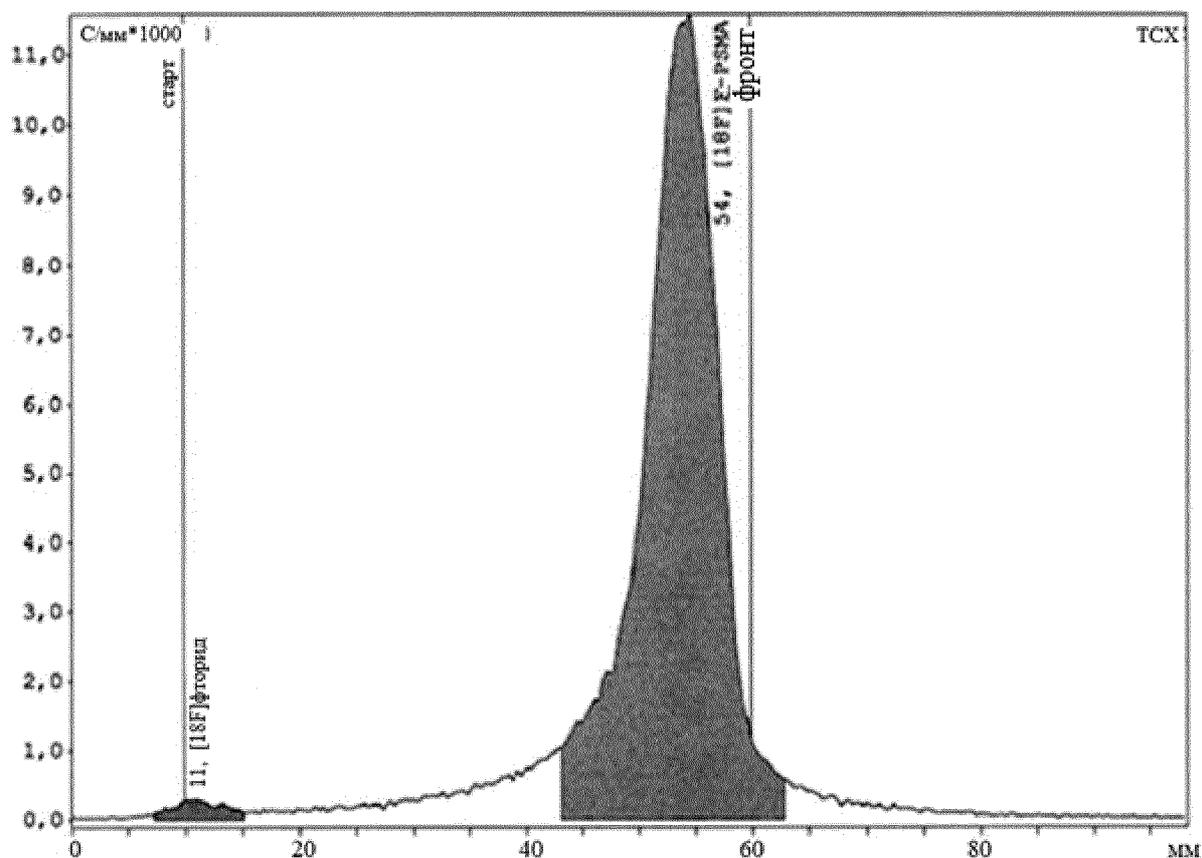


Фиг. 18



СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ
РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

Фиг. 19

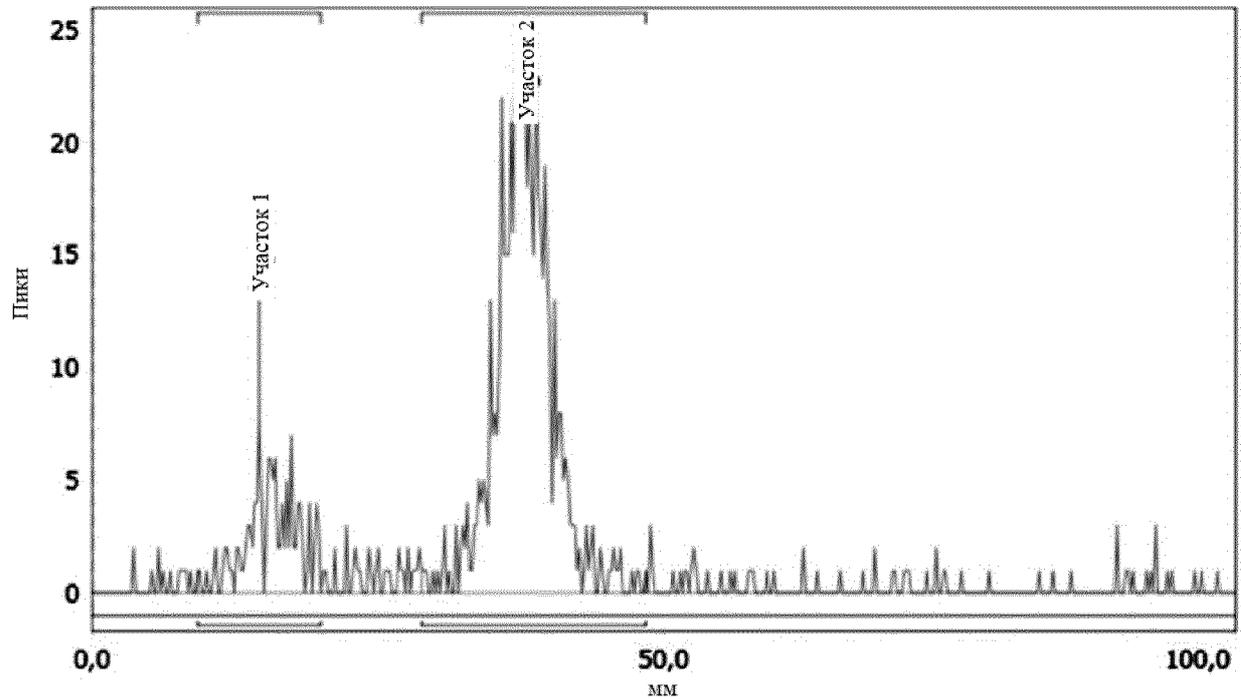


Интеграционная ТСХ

Вещество	RF	%Общий %	Тип	Площадь пиков	%Площади %	Инструмент	Накоп. мм	Отношение S/N
[18F] фторид	0,013	1,50	DD(1614,00	1,74	ТСХ	10,52	6,3
[18F]F-PSMA	0,888	84,68	DD(91023,00	98,26	ТСХ	54,27	167,5
Общее в области интереса (ROI)				92637,00	100,00			
Общая площадь				107492,00				
Площадь (общая) RF				99480,00				

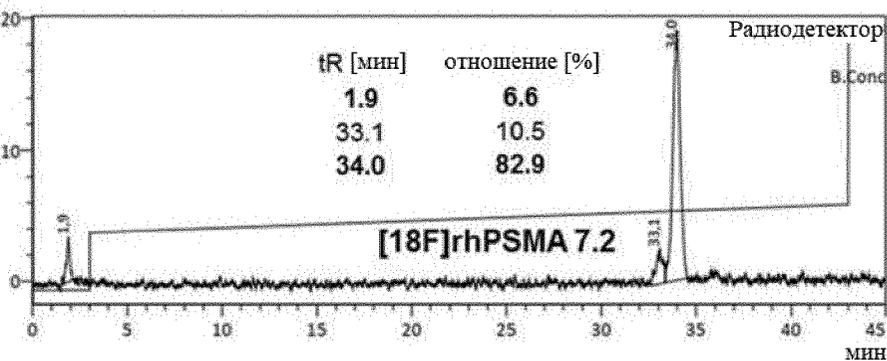
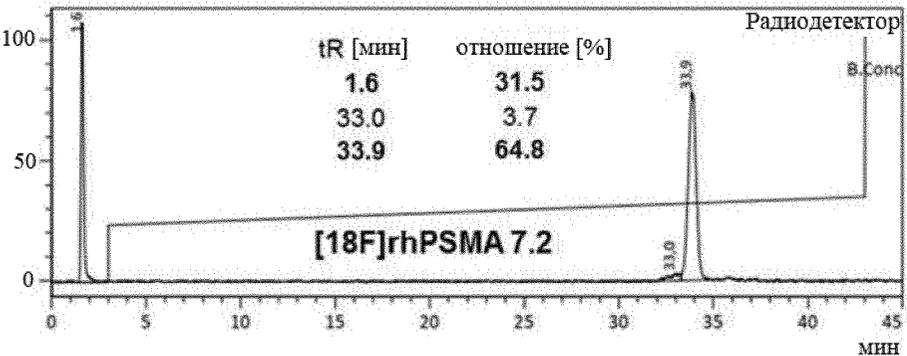
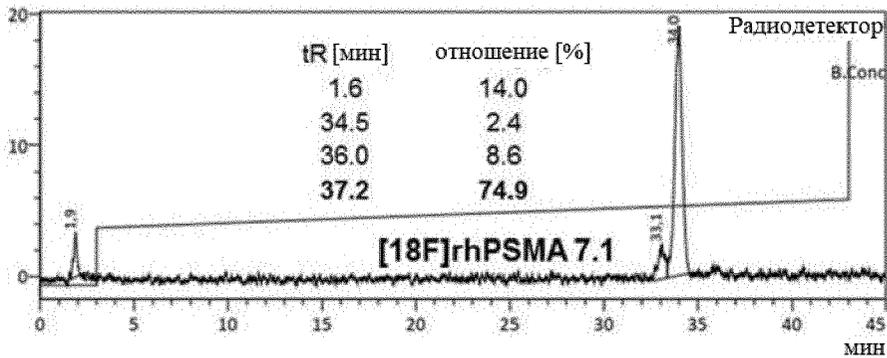
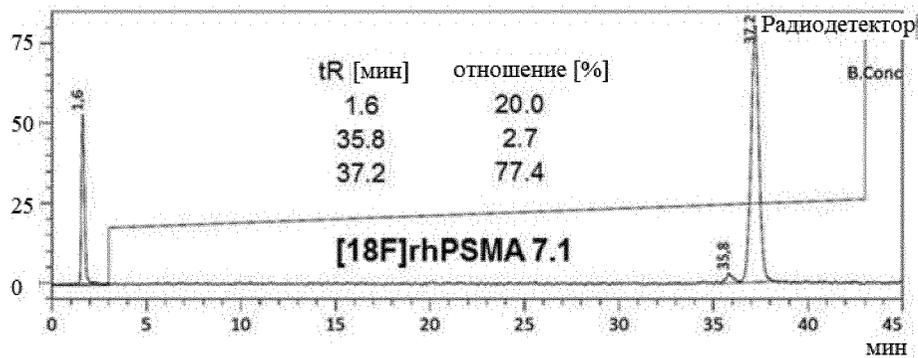
СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ
РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

Фиг. 20

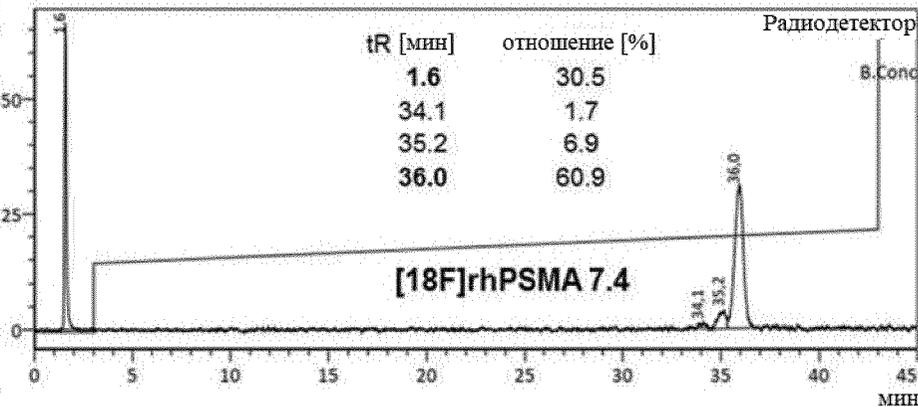
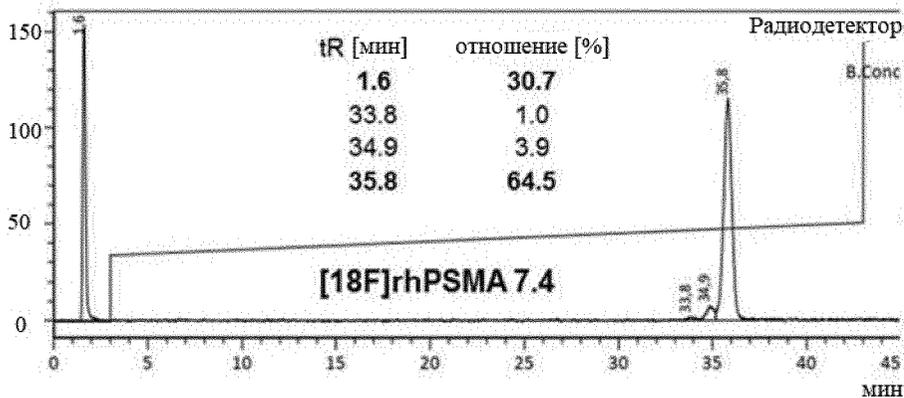
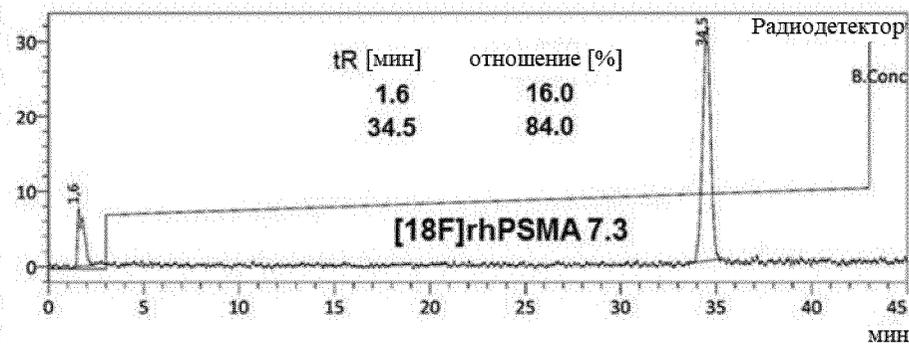
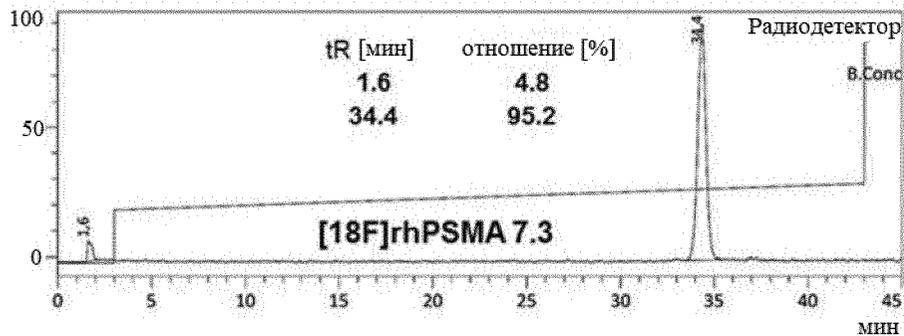


Участки:	^{18}F		Детектор:	PMT		
Название	старт (мм)	конец (мм)	Удерживание (RF)	площадь (пики)	% ROI (%)	%Общий (%)
Участок 1	9,2	20,0	0,073	127	17,49	14,02
Участок 2	28,8	48,4	0,189	599	82,51	66,11
2 пика				726	100,00	80,13

Фиг. 21

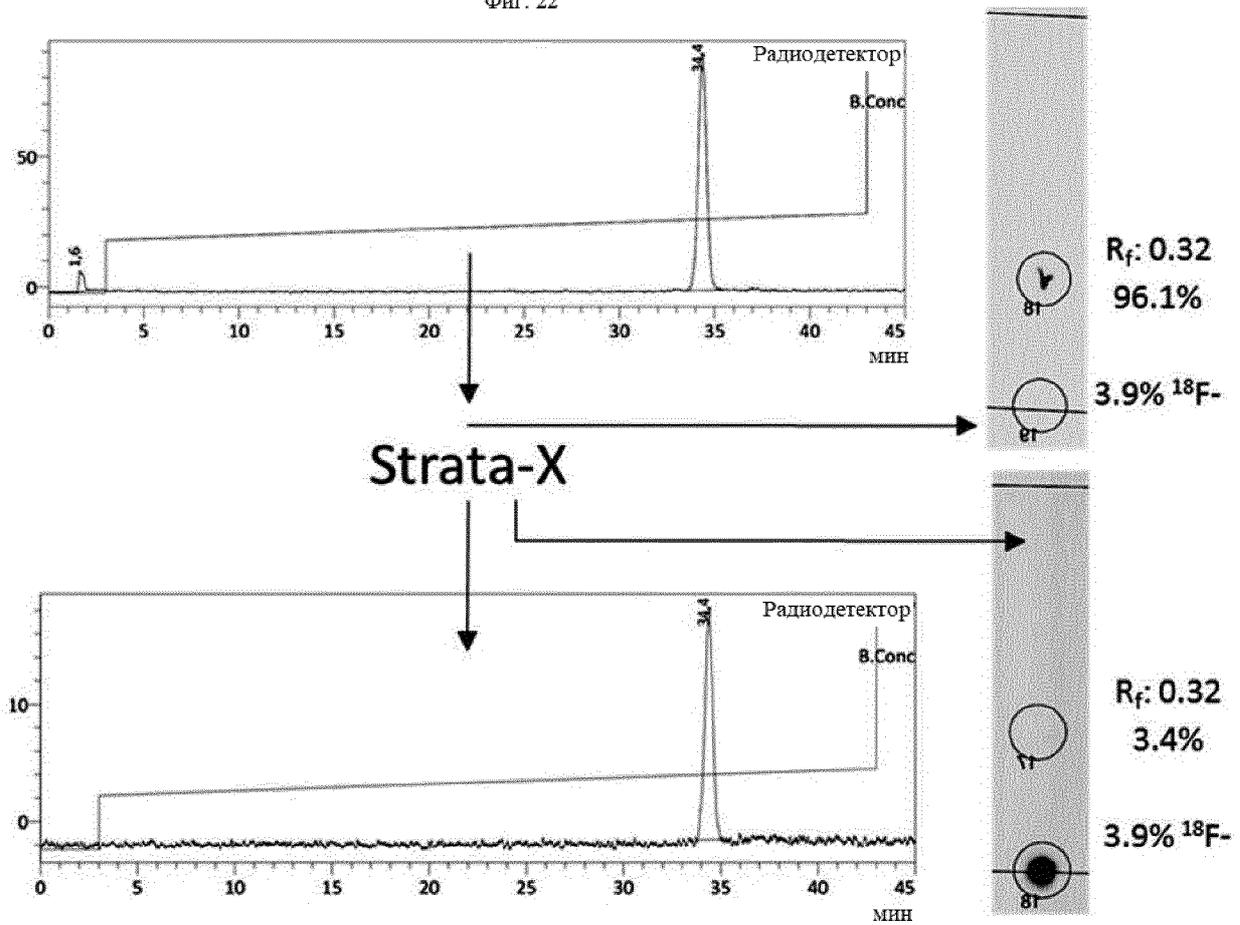


Фиг. 21 (продолжение)

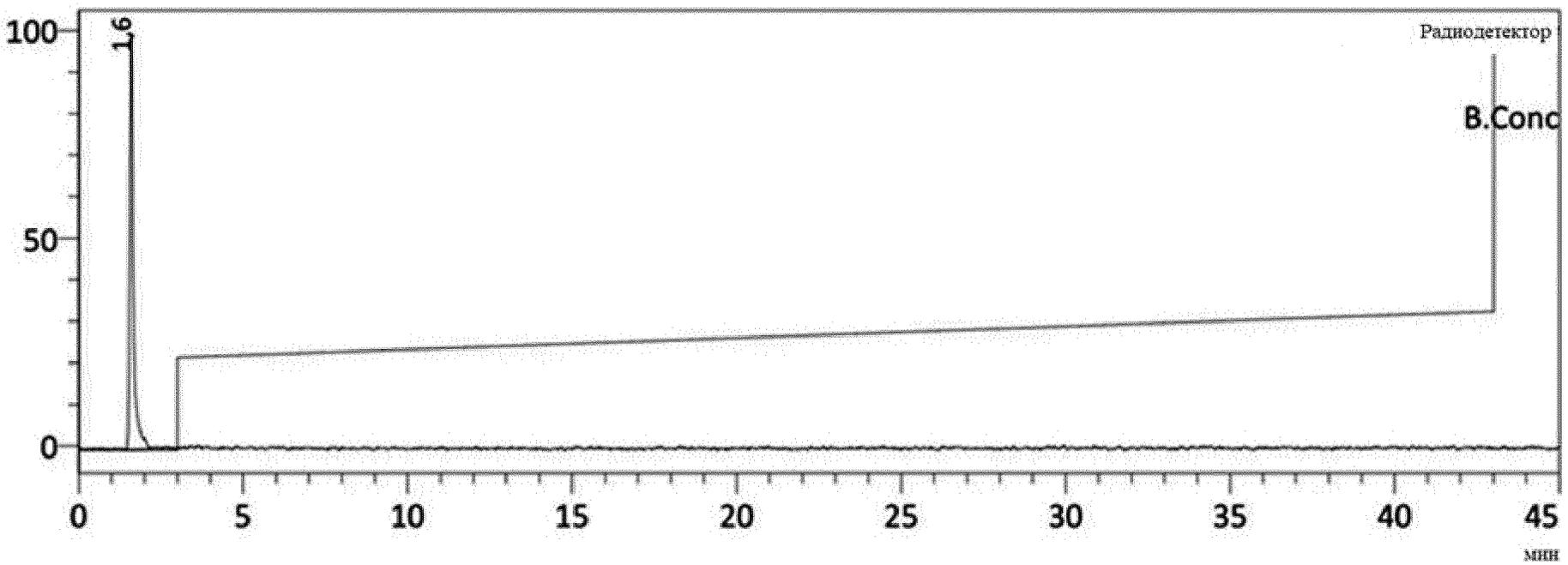


СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ
РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

Фиг. 22



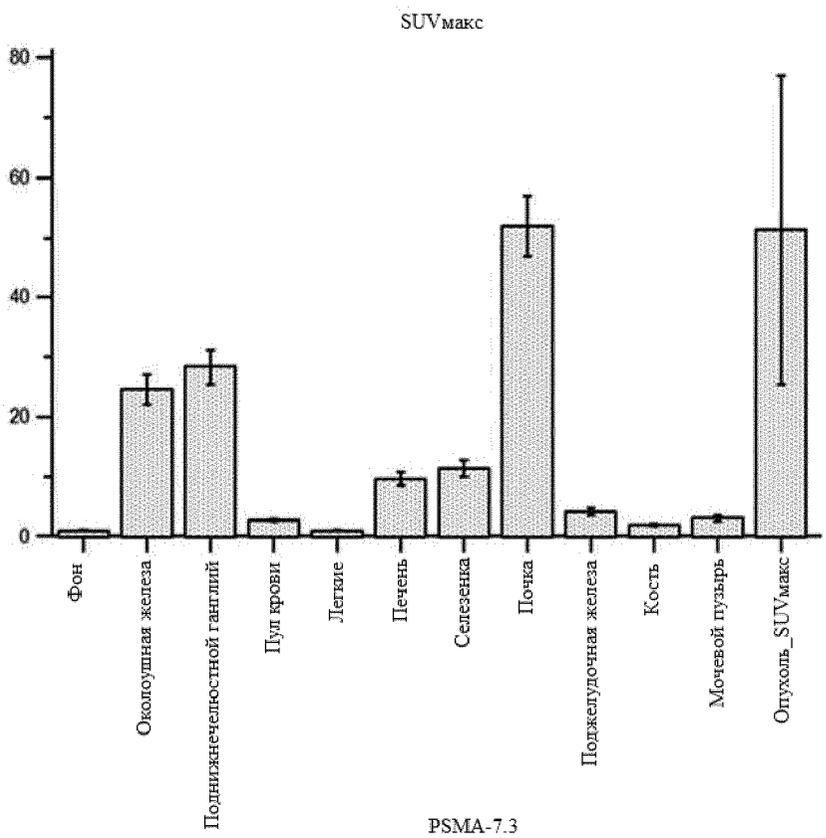
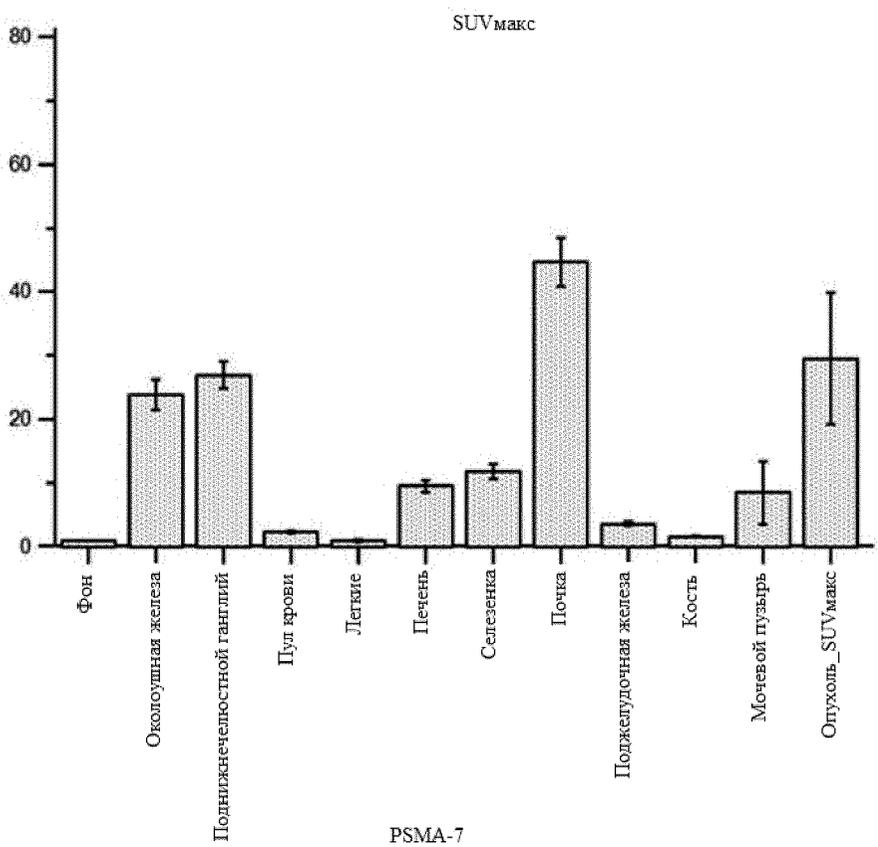
Фиг. 23



СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

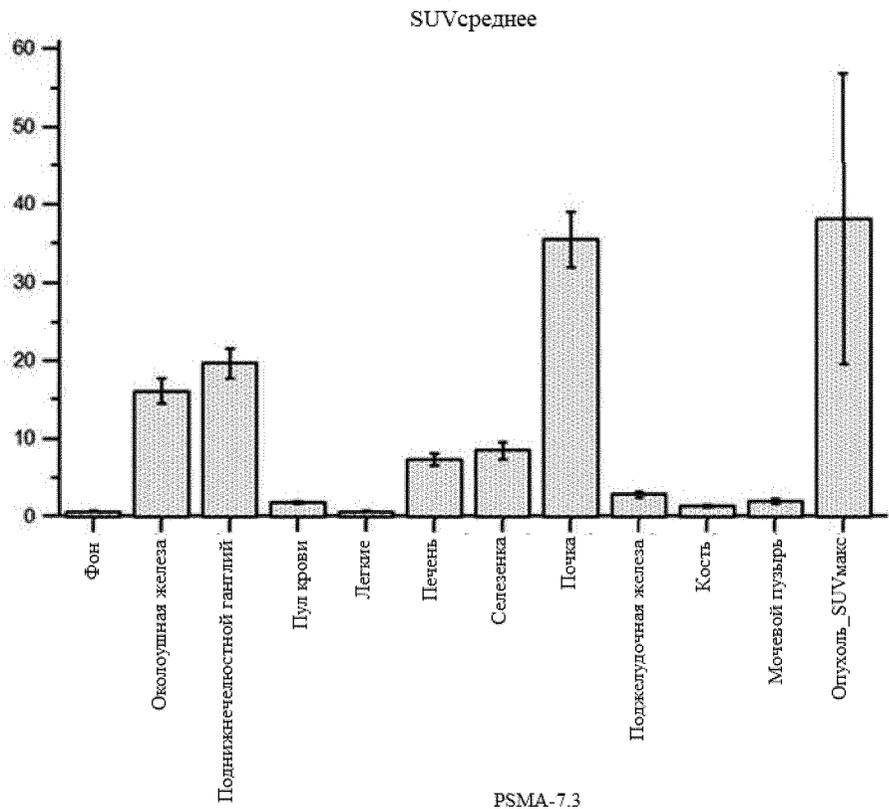
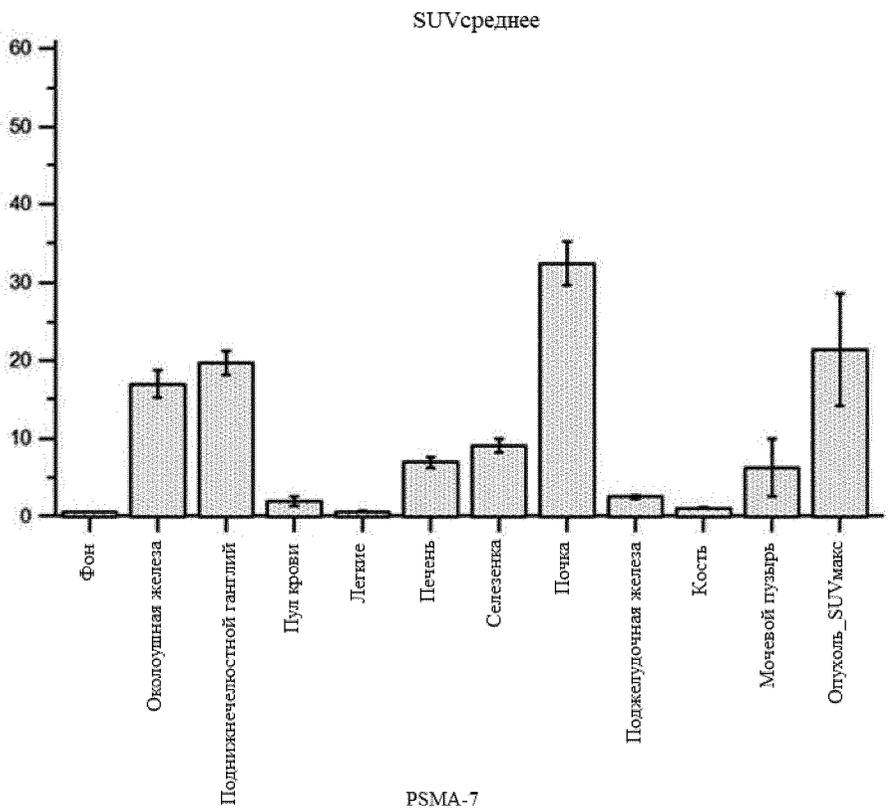
Фиг. 24



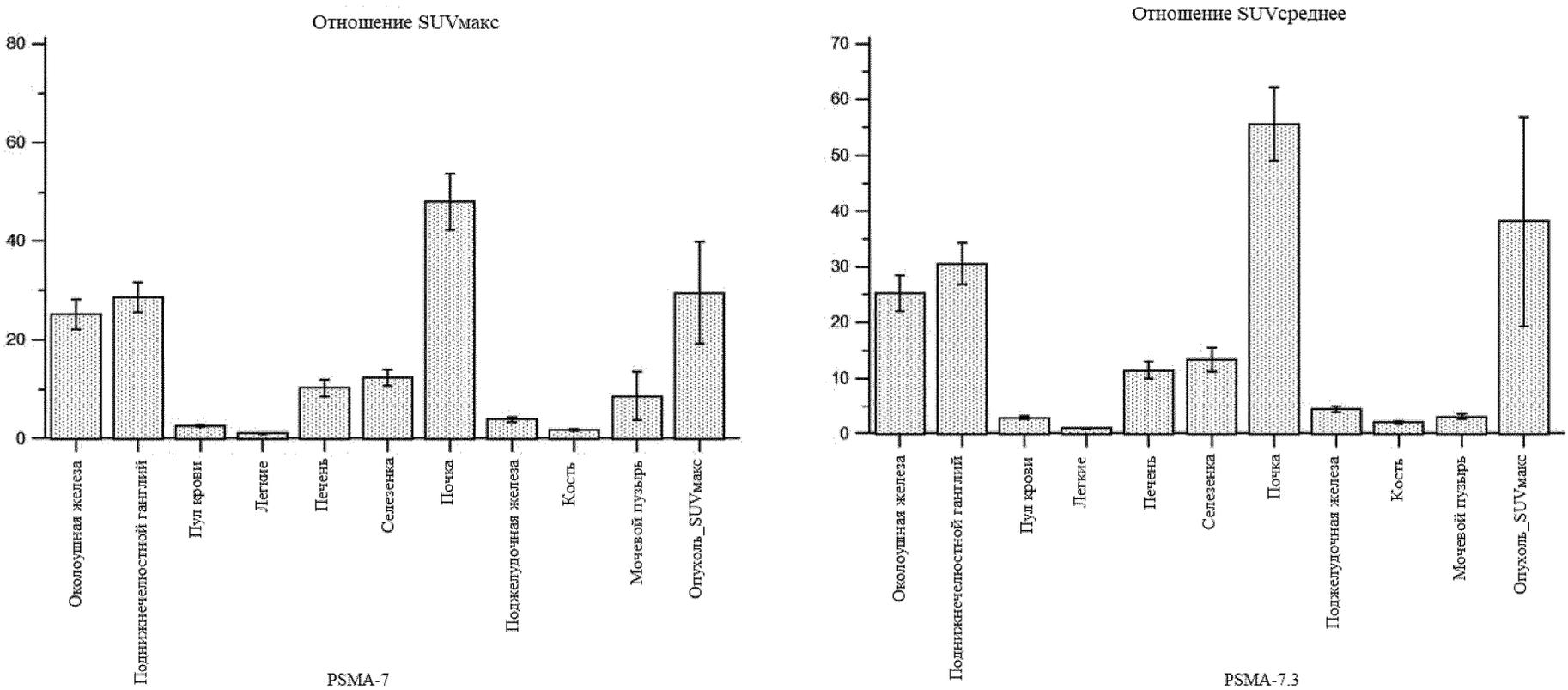
СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

Фиг. 25

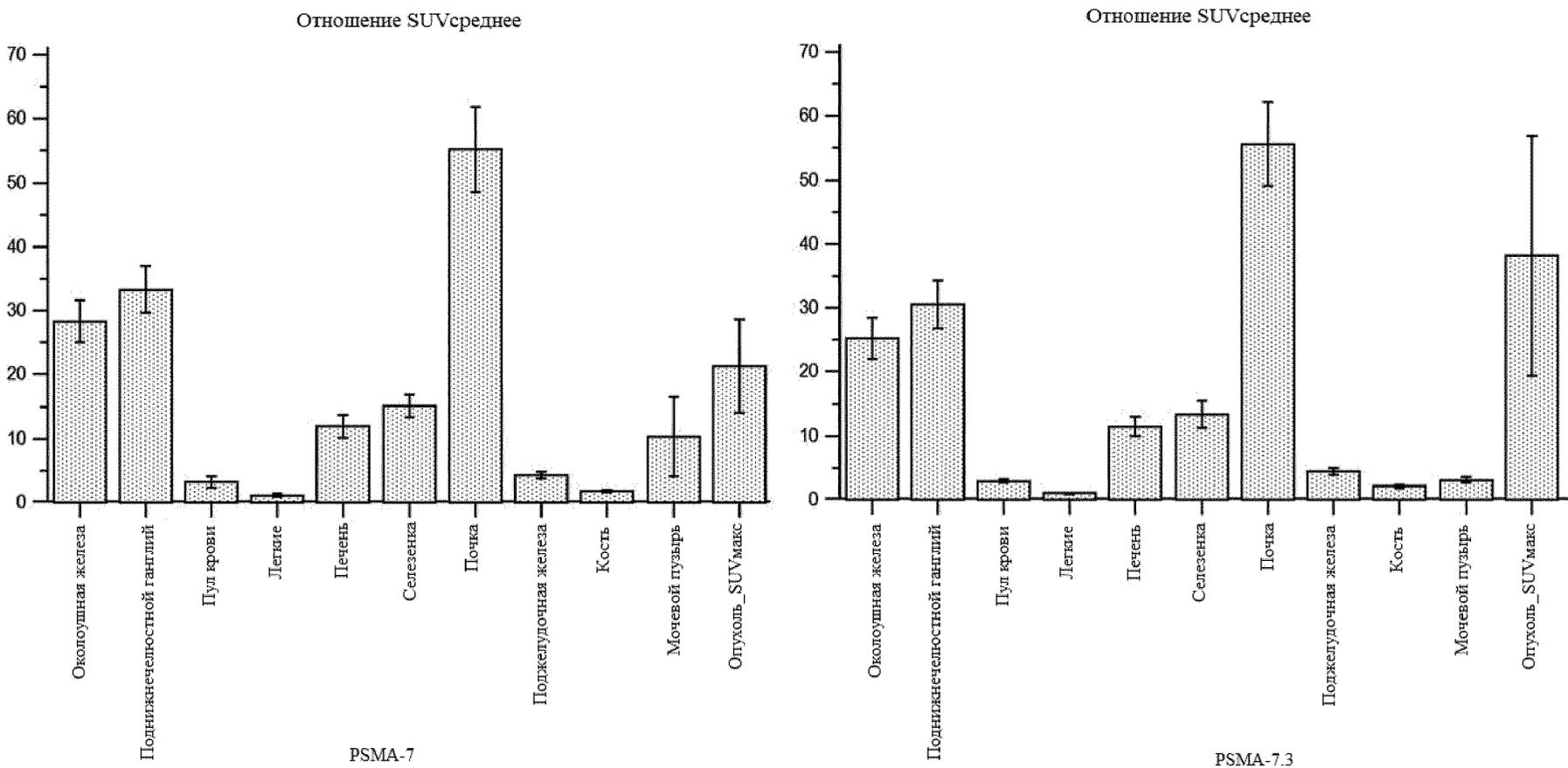


Фиг. 26



СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ
РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

Фиг. 27



СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ
РАКОВОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

Фиг. 28

