

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 046339

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.03.01

(21) Номер заявки
202191691

(22) Дата подачи заявки
2020.01.30

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 51/04 (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)
C07B 59/00 (2006.01)

(54) РАДИОАКТИВНАЯ МЕТКА, СВЯЗЫВАЮЩАЯ PSMA ДВУМЯ СПОСОБАМИ, И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО

(31) 19154500.3

(32) 2019.01.30

(33) EP

(43) 2021.11.01

(86) PCT/EP2020/052248

(87) WO 2020/157177 2020.08.06

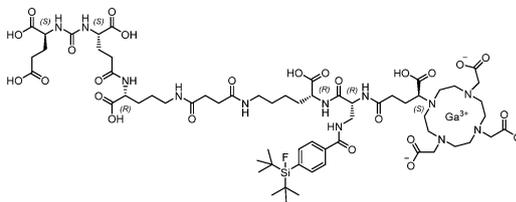
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ТЕХНИШЕ УНИВЕРЗИТЕТ
МЮНХЕН; ТЕХНИШЕ
УНИВЕРЗИТЕТ МЮНХЕН -
КЛИНИКУМ РЕХТС ДЕР ИЗАР (DE)

(72) Изобретатель:
Вурцер Александер Йозеф, Вестер
Ханс-Йюрген, Айбер Маттиас
Иоганнес (DE)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Билык А.В., Дмитриев А.В., Черкас
Д.А., Игнатъев А.В., Путинцев А.И.
(RU)

(56) S. LITAU ET AL.: "Next Generation of SiFA lin-Based TATE Derivatives for PET Imaging of SSTR-Positive Tumors: Influence of Molecular Design on In Vitro SSTR Binding and In Vivo Pharmacokinetics", *BIOCONJUGATE CHEMISTRY*, vol. 26, no. 12, 16 December 2015 (2015-12-16), pages 2350-2359, XP055452403, US ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00510, figures 1-4, abstract
WO-A1-2019020831

(57) В изобретении предложено соединение



или его фармацевтически приемлемая соль. Также предложены способ получения указанного соединения, применение и способ визуализации и/или диагностики рака, включающий введение указанного соединения нуждающемуся в этом пациенту.

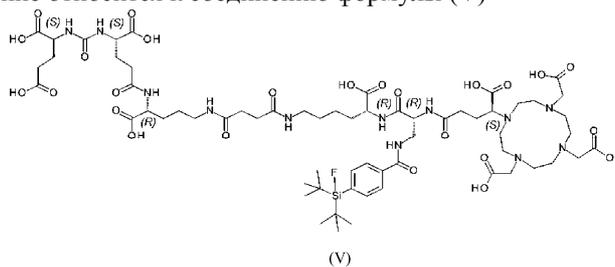
B1

046339

046339

B1

Настоящее изобретение относится к соединению формулы (V)



или его фармацевтически приемлемой соли, включающему либо хелатный радиоактивный катион, либо где F необязательно представляет собой ^{18}F . Настоящее изобретение также относится к способу синтеза соединения, которое предотвращает рацемизацию во время синтеза.

В данном описании цитируется ряд документов, включая заявки на патенты и руководства производителей. Раскрытие этих документов, хоть и не считается релевантным для патентоспособности настоящего изобретения, полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. Более конкретно, все упомянутые документы включены посредством ссылки в том же объеме, как если бы каждый отдельный документ был специально и индивидуально указан для включения посредством ссылки.

Рак предстательной железы

Рак предстательной железы (РПЖ) в течение последних десятилетий остается самым распространенным злокачественным заболеванием среди мужчин с высокой частотой заболеваемости и низкой выживаемостью. Благодаря сверхэкспрессии при раке предстательной железы свою пригодность в качестве отличной мишени для разработки высокочувствительных радиоактивно меченных агентов для эндолучевой терапии и визуализации РПЖ обеспечили простат-специфический мембранный антиген (PSMA) или глутаматкарбокисипептидаза II (GCP II). Простат-специфический мембранный антиген представляет собой внеклеточную гидролазу, каталитический центр которой состоит из двух ионов цинка (II) с мостиковым гидроксидолигандом. Он сильно повышен 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 простаты. В кишечнике PSMA способствует всасыванию фолиевой кислоты за счет преобразования птероилполи- γ -глутамата в птероилглутамат (фолат). В головном мозге он гидролизует N-ацетил-ласпартил-L-глутамат (NAAG) до N-ацетил-L-аспартата и глутамата.

Простат-специфический мембранный антиген (PSMA)

Простат-специфический мембранный антиген (PSMA) представляет собой трансмембранный гликопротеин типа II, который высоко сверхэкспрессируется на эпителиальных клетках рака предстательной железы. Несмотря на свое название, PSMA также в разной степени выражен в неоваскулярной сети широкого спектра раков, не относящихся к раку предстательной железы. Среди наиболее распространенных видов рака, не связанных с предстательной железой, экспрессия PSMA наблюдается при раке молочной железы, раке легких, колоректальном раке и при почечно-клеточной карциноме.

Общие необходимые структуры молекул, нацеленных на PSMA, включают связывающую единицу, которая включает цинк-связывающую группу (такую как мочевины, фосфинат или фосфорамидат), связанную с глутаматным фрагментом P1', которая гарантирует высокое сродство и специфичность к PSMA и обычно дополнительно связана с эффекторной функциональностью. Эффекторная часть более гибкая и в некоторой степени толерантна к структурным модификациям. Входная воронка вмещает две другие важные структурные особенности, которые важны для связывания лиганда. Первой является аргининовый патч, положительно заряженная область на стенке входной воронки и механистическое объяснение предпочтения отрицательно заряженных функциональных групп в позиции P1 PSMA. Это, по-видимому, является причиной предпочтительного включения отрицательно заряженных остатков в лиганд-каркас. Насколько нам известно, углубленный анализ влияния положительных зарядов на лиганды PSMA до сих пор не проводился. При связывании согласованная перестановка 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 высокому сродству к 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 арен-связывающий сайт представляет собой простой структурный мотив, образованный боковыми цепями Arg463, Arg511 и Trp541, и является частью входной крышки GCP II. Вовлечение сайта связывания арена дистальным мотивом ингибитора может привести к значительному увеличению сродства ингибитора к PSMA из-за эффектов avidности. PSMA I&T был разработан с намерением взаимодействовать таким образом с PSMA, хотя анализ кристаллической структуры схемы связывания отсутствует. Необходимой особенностью согласно Zhang et al. является линкер (субериновая кислота в случае PSMA I&T), который способствует открытой конформации входной крышки GCP II и тем самым

обеспечивает доступность арен-связывающего сайта. Кроме того, было показано, что структурный состав линкера оказывает значительное влияние на нацеливание на опухоль и биологическую активность, а также на контрастность визуализации и фармакокинетику (Liu et al., *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 21, 7013-7016 (2011)), свойства, которые имеют решающее значение как для высокого качества визуализации, так и для эффективной направленной эндорадиотерапии.

В настоящее время в клинических условиях применяются две категории целевых ингибиторов PSMA. С одной стороны, есть индикаторы с хелатирующими единицами для комплексообразования радионуклидов, такими как PSMA I&T или родственные соединения. С другой стороны, есть малые молекулы, включающие нацеливающую единицу, и эффекторные молекулы.

Наиболее часто применяемыми агентами для селективной визуализации PSMA являются PSMA HBED-CC, PSMA-617 и PSMA I&T, которые преимущественно помечены ^{68}Ga (88,9% β^+ , $E_{\beta^+, \text{max}} = 1,89$ МэВ, $t_{1/2} = 68$ мин). Среди них ^{68}Ga -PSMA-HBED-CC (также известный как ^{68}Ga -PSMA-11) до сих пор считается золотым стандартом ПЭТ-визуализации (позитронно-эмиссионная томография) РПЖ.

^{18}F мечение

В последнее время несколько групп сосредоточились на разработке новых ингибиторов на основе мочевины, меченных ^{18}F , для диагностики РПЖ. В отличие от радиометалла ^{68}Ga , который можно получить из коммерчески распространенных генераторов радионуклидов $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (^{68}Ge ; $t_{1/2}=270,8$ сут), радиоизотоп ^{18}F -фторид (96,7% β^+ , $E_{\beta^+, \text{max}} = 634$ кэВ) требует наличия циклотрона на месте для его получения. Несмотря на это ограничение, ^{18}F , благодаря более длительному периоду полураспада ($t_{1/2} = 109,8$ мин) и более низкой энергии позитронов, имеет значительные преимущества с точки зрения рутинной обработки и качества визуализации. Кроме того, существует возможность крупномасштабного производства на циклотроне, что было бы полезно для увеличения пропускной способности пациентов и снижения производственных затрат. Меченый ^{18}F ингибитор PSMA на основе мочевины ^{18}F -DCFPy1 продемонстрировал многообещающие результаты в выявлении первичного и метастатического РПЖ (Rowe et al, *Molecular Imaging and Biology*, 1-9 (2016)) и превосходство над ^{68}Ga -PSMA-HBED-CC в сравнительном исследовании (Dietlein et al., *Molecular Imaging and Biology* 17, 575-584 (2015)). На основе структуры PSMA-617 недавно был разработан ^{18}F -меченный аналог PSMA-1007, который показал сопоставимое соотношение опухоль/орган (Cardinale et al., *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 58, 425-431 (2017); Giesel et al., *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 43, 1929-1930 (2016)). Сравнительное исследование с ^{68}Ga -PSMA-HBED-CC показало схожую диагностическую точность обоих индикаторов и снижение мочевого клиренса ^{18}F -PSMA-1007, что позволило лучше оценить предстательную железу (Giesel et al., *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 44, 678-688 (2017)).

Приемлемым подходом для введения меток ^{18}F является применение акцепторов фторида кремния (SIFA). Акцепторы фторида кремния описаны, например, в Lindner et al., *Bioconjugate Chemistry* 25, 738-749 (2014). Для того, чтобы сохранить связь кремний-фторид, применение акцепторов фторида кремния включает необходимость создания стерически сложных групп вокруг атома кремния. Это, в свою очередь, делает акцепторы фторида кремния очень гидрофобными. Что касается связывания с молекулой-мишенью, в частности с молекулой-мишенью, которой является PSMA, гидрофобный фрагмент, обеспечиваемый акцептором фторида кремния, может быть применен для установления взаимодействий радиодиагностического или терапевтического соединения с гидрофобным карманом, как описано в Zhang et al., *Journal of the American Chemical Society* 132, 12711-12716 (2010). Однако, до связывания, более высокая степень липофильности, введенная в молекулу, представляет серьезную проблему в отношении разработки радиофармацевтических препаратов с подходящим биораспределением *in vivo*, т.е. низким неспецифическим связыванием в нецелевых тканях.

Неспособность решить проблему гидрофобности

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

Для дальнейшего объяснения Schirmacher E. et al. (*Bioconjugate Chem.* 2007, 18, 2085-2089) синтезировали различные ^{18}F -меченные пептиды с применением высокоэффективного меченного синтона п-(ди-трет-бутилфторсиллил) бензальдегида (^{18}F SIFA-A), который является одним из примеров акцептора фторида кремния. Способ SIFA привел к неожиданно эффективному изотопному обмену ^{19}F - ^{18}F и позволил получить ^{18}F -синтон с почти количественным выходом при высокой удельной активности от 225 до 680 ГБк/мкмоль (6081-18 378 Ки/ммоль) без применения очистки HPLC (высокоэффективная жидкостная хроматография). ^{18}F SIFA-бензальдегид, наконец, был применен для мечения N-концевых аминоксидов (N-AO) дериватизированных пептидов АО-Тур3-октреотата (АО-TATE), цикло(fK(AO-N)RGD) и N-AO-PEG₂-[D-Тур-Gln-Тур-Ala-Val-Ala-His-Thi-Nle-NH₂] (АО-BZH3, производное бомбезина) с высоким радиохимическим выходом. Тем не менее, меченые пептиды обладают высокой липофильностью (что можно определить по времени удерживания при HPLC при применении условий, описанных в настоящей заявке), и поэтому они не подходят для дальнейшей оценки на животных моделях или на людях.

В работе Wangler C. et al. (*Bioconjugate Chem.*, 2009, 20 (2), pp 317-321) было описано первое ра-

диофторирование белка (сывороточного альбумина крысы, RSA) с помощью набора на основе SIFA. В качестве меченого агента был получен 4-(ди-tert-бутил¹⁸F]фторсилил)бензениол (Si¹⁸F]FA-SH) путем простого изотопного обмена с радиохимическим выходом (РХВ) 40-60% и соединен непосредственно с малеимидным дериватизированным сывороточным альбумином с общим РХВ 12% в течение 20-30 мин. Технически простая процедура мечения не требует каких-либо сложных процедур очистки и является простым примером успешного применения химии Si-¹⁸F для визуализации *in vivo* с помощью ПЭТ. Кривые время/активность и визуализация μ PET мышей показали, что большая часть активности была локализована в печени, тем самым демонстрируя, что маркирующий агент является слишком липофильным и направляет зонд *in vivo* на гепатобилиарную экскрецию и экстенсивный печеночный метаболизм.

Wangler C. et al. (см. *Bioconjug Chem.* 2010 Dec 15;21(12):2289-96) впоследствии попытались преодолеть главный недостаток технологии SIFA, которым является высокая липофильность получаемых радиофармацевтических препаратов, 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 этих соединениях между пептидом и фрагментом SIFA были введены гидрофильные линкеры и фармакокинетические модификаторы, т.е. углевод и ПЭГ-линкер плюс углевод. В качестве меры липофильности конъюгатов был определен $\log P(ow)$, который составил 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 незначительно компенсирована применением гидрофильных соединений. Первое исследование визуализации продемонстрировало чрезмерный печеночный клиренс/накопление печеню и поэтому не было перенесено в первое исследование на человеке.

Bernard-Gauthier et al. (*Biomed Res Int.* 2014;2014:454503) рассматривали большое количество различных фрагментов SIFA, о которых сообщалось в литературе, начиная от небольших простетических групп и других соединений с низкой молекулярной массой до меченых пептидов и совсем недавних молекул аффител. На основании этих данных проблема липофильности простетических групп на основе SIFA до сих пор не решена; т.е. не описана методика, которая снижает общую липофильность конъюгированного с SIFA пептида до $\log D$ ниже, чем приблизительно минус 2,0.

В работе 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 $\alpha v \beta 3$ были синтезированы и помечены фрагментом акцептора фторида кремния (SIFA). Для компенсации высокой липофильности фрагмента SIFA были введены различные гидрофильные модификации структуры, которые привели к снижению значений $\log D$. SIFA-Asn(AcNH- β -Glc)-PESIN, SIFA-Ser(β -Lac)-PESIN, SIFA-Cya-PESIN, SIFA-LysMe3-PESIN, SIFA- γ -карбокси-d-Glu-PESIN, SIFA-Cya2-PESIN, SIFA-LysMe3- γ -карбокси-d-Glu-PESIN, SIFA-(γ -карбокси-d-Glu)2-PESIN, SIFA-RGD, SIFA- γ -карбокси-d-Glu-RGD, SIFA-(γ -карбокси-d-Glu)2-RGD, SIFA-LysMe3- γ -carboxy-d-Glu-RGD. Все эти пептиды представляют собой уже улучшенные и дериватизированные с целью снижения липофильности пептиды, которые показали значение $\log D$ в диапазоне от 2 до минус 1,22.

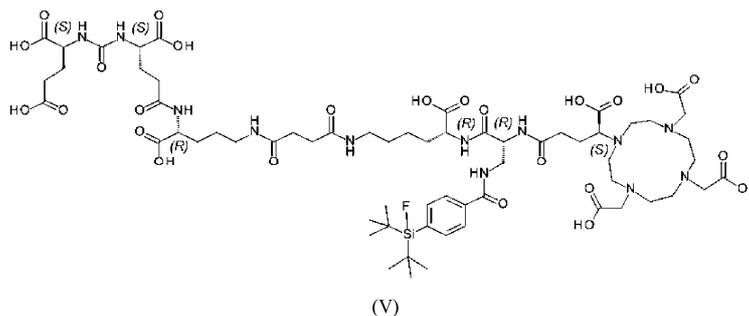
В работе Niedermoser S. et al. (*J Nucl Med.* 2015 Jul;56(7):1100-5), недавно разработанные производные ¹⁸F-SIFA- и ¹⁸F-SIFAlin-(SIFA=акцептор фторида кремния) и модифицированные TATE сравнивались с текущим клиническим золотым стандартом ⁶⁸Ga-DOTATATE для высококачественной визуализации опухолей, несущих рецепторы соматостатина. Для этой цели были разработаны ¹⁸F-SIFA-TATE и два довольно сложных аналога, ¹⁸F-SIFA-Glc-PEG1-TATE, ¹⁸F-SIFAlin-Glc-Asp2-PEG1-TATE. Ни один из агентов не показал $\log D$ менее минус 1,5.

С учетом вышеизложенного, техническая задача, лежащая в основе настоящего изобретения, заключается в создании радиодиагностических и радиотерапевтических препаратов, включающих силиконовый фторидный акцептор и в то же время характеризующихся благоприятными свойствами *in vivo*.

Как станет ясно из дальнейшего, в настоящем изобретении была проведена экспериментальная проверка с применением специфических конъюгатов, которые с высоким сродством связываются с простат-специфическим антигеном (PSMA) в качестве мишени. Соответственно, еще одна техническая задача, лежащая в основе настоящего изобретения, заключается в обеспечении улучшенных радиотерапевтических и диагностических средств для медицинских показаний, которыми является рак, предпочтительно рак предстательной железы.

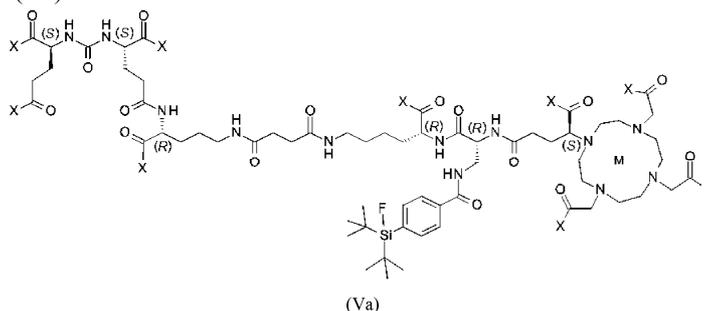
В РСТ/ЕР 2018/070533 раскрыт род соединений, связывающих PSMA. В настоящей заявке раскрыта более выгодная подгруппа соединений из предыдущей заявки. Настоящая заявка представляет собой подборку преимущественных признаков, не оцененных изобретателями на момент подачи РСТ/ЕР 2018/070533.

Эти технические проблемы решаются предметом формулы изобретения. Соответственно, в некоторых аспектах настоящее изобретение относится к соединению формулы (V):



или его фармацевтически приемлемой соли, включающему хелатный радиоактивный катион, или, где F необязательно представляет собой ^{18}F .

Раскрытые соединения могут находиться в форме солей. Настоящее изобретение также относится к соединениям формулы (Va)



или его фармацевтически приемлемой соли, где каждый X независимо является OH или O-;

M представляет собой хелатный радиоактивный катион или отсутствует и F необязательно представляет собой ^{18}F .

Кроме того, сочетание применения хелатора и изотопного обмена на SIFA с помощью ^{18}F -фторида также приводит к получению "парных" диагностических индикаторов, которые могут применяться в качестве индикаторов [^{18}F]^{нат}ион в центрах с собственным циклотроном или центрах, получающих ^{18}F -фторид путем отгрузки из циклотронных центров, тогда как в центрах, не имеющих доступа к ^{18}F -фториду, но имеющих доступ к радиоизотопным генераторам, таким как генератор Ge-68/Ga-68, могут быть применены соответствующие версии, например, индикаторы [^{nat}F]⁶⁸Ga.

Важно отметить, что в обоих случаях вводится химически идентичный радиофармацевтический препарат, и поэтому не ожидается никаких различий в поведении *in vivo*. Принимая во внимание, что в настоящее время из-за химических различий клинические данные меченного ^{18}F соединения, предоставленные группой пациентов в одном учреждении, нельзя напрямую сравнивать с клиническими данными аналога ^{68}Ga , предоставленного другой группой в другом учреждении, радиофармацевтические препараты и/или диагностика согласно изобретению могут быть напрямую сравнены, что позволит связать такие данные (например, данные из центра в Европе, работающего с F-18, и другого центра в Индии, работающего с Ga-68).

Кроме того, при соответствующем подборе хелат может быть применен для маркировки терапевтическим изотопом, таким как бета-излучающие изотопы Lu-177, Y-90 или альфа-излучающий изотоп Ac-225, что позволяет расширить понятие "парных" индикаторов для объединения диагностических (^{18}F]^{нат}Lu индикаторы) и терапевтических радиофармпрепаратов (^{nat}F]¹⁷⁷Lu).

Еще одним 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 эта комбинация структурного элемента SIFA с хелатором обеспечивает неожиданное снижение накопления в почках.

Что касается липофильности/гидрофильности, значение logP (иногда также называемое значением logD) является признанной мерой.

Термин "липофильность" относится к способности растворяться или абсорбироваться в липидных растворах, 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" применяется в настоящем изобретении в эквивалентном значении. Прилагательные липофильный и гидрофобный применяются в значении, соответствующем описанным выше веществам.

Массовый поток молекулы на границе раздела двух несмешивающихся или по существу несмешиваемых растворителей определяется ее липофильностью. Чем более липофильна молекула, тем больше

она растворима в липофильной органической фазе. Коэффициент распределения молекулы, который наблюдается между водой и н-октанолом, был принят в качестве стандартной меры липофильности. Коэффициент разделения P разновидности A определяется как отношение $P = [A]_{\text{н-октанол}} / [A]_{\text{вода}}$. Обычно указывается значение $\log P$, которое является логарифмом коэффициента разделения. В случае, если молекула является ионизируемой, множество различных микрочастиц (ионизированные и неионизированные формы молекулы) в принципе будут присутствовать в обеих фазах. Величина, описывающая общую липофильность ионизируемого вещества, представляет собой коэффициент распределения D , определяемый как отношение $D = [\text{сумма концентраций всех микрочастиц}]_{\text{н-октанол}} / [\text{сумма концентраций всех микрочастиц}]_{\text{вода}}$. Как и в случае с $\log P$, часто указывается логарифм коэффициента распределения, $\log D$. Часто буферная система, такая как забуференный фосфатом физиологический раствор, применяется в качестве альтернативы воде в вышеописанном определении $\log P$.

Если необходимо оценить и/или количественно определить липофильный характер заместителя в первой молекуле, можно оценить вторую молекулу, соответствующую этому заместителю, причем указанная вторая молекула получена, например, путем разрыва связи, соединяющей этот заместитель с остальной частью первой молекулы, и присоединения (полученных таким образом) свободных валентностей к водороду (водородам).

В качестве альтернативы можно определить вклад заместителя в $\log P$ молекулы. Вклад π_{X-X} заместителя X в $\log P$ молекулы $R-X$ определяется 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 π_{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 π_{X-X} меньше нуля указывают на гидрофильный характер соответствующих молекул или заместителей.

Вышеописанные параметры, характеризующие липофильность липофильной группы или всей молекулы согласно 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 изобретению составляет от -5 до -1,5. Особенно предпочтительно, чтобы значение $\log P$ составляло от -3,5 до -2,0.

В предпочтительном воплощении хелатирующая группа включает хелатный катион, который является радиоактивным. Более предпочтительным является хелатный изотоп радиоактивного металла.

Предпочтительными примерами катионов, которые могут быть хелатированы хелатирующей группой, являются катионы ^{43}Sc , ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{51}Cr , $^{52\text{m}}\text{Mn}$, ^{58}Co , ^{52}Fe , ^{56}Ni , ^{57}Ni , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{89}Y , менее Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{97}Ru , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{111}Ag , $^{110\text{m}}\text{In}$, ^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, $^{114\text{m}}\text{In}$, $^{117\text{m}}\text{In}$, ^{121}Sn , ^{127}Te , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{151}Pm , ^{149}Tb , ^{152}Tb , ^{155}Tb , ^{161}Tb , ^{153}Sm , ^{157}Gd , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{165}Dy , ^{169}Er , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{172}Tm , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{191}Pt , ^{197}Hg , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{212}Pb , ^{203}Pb , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{227}Th , катионная молекула, включающая ^{18}F или катион, такой как $^{18}\text{F}-[\text{AlF}]^{2+}$; более предпочтительно катионы ^{44}Sc , ^{47}Sc , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{68}Ga , ^{90}Y , ^{111}In , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{188}Re , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{225}Ac и ^{227}Th или катионную молекулу, включающую F . Катионы могут быть выбраны из Lu-177 , Y-90 или Ac-225 .

В дополнительном аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, включающую или состоящую из одного или более соединений по изобретению, как раскрыто в настоящей заявке выше.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение обеспечивает диагностическую композицию, включающую или состоящую из одного или более соединений по изобретению, как раскрыто в настоящей заявке выше.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение обеспечивает терапевтическую композицию, включающую или состоящую из одного или более соединений по изобретению, как раскрыто в настоящей заявке выше.

Фармацевтическая композиция может дополнительно включать фармацевтически приемлемые носители, наполнители и/или разбавители. Примеры подходящих фармацевтических носителей, наполнителей и/или разбавителей хорошо известны в данной области техники и включают фосфатно-солевые растворы, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы и т.д. Композиции, включающие такие носители, могут быть составлены хорошо известными традиционными способами. Эти фармацевтические композиции можно вводить субъекту в подходящей дозе. Введение подходящих композиций может осуществляться различными способами, например, путем внутривенного, внутрибрюшинного, подкожного, внутримышечного, местного, внутрикожного, интраназального или интробронхиального введения. Особенно предпочтительно, чтобы указанное введение осуществляли 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 участок, например, путем биологической доставки к внешнему или внутрен-

нему целевому участку, например, поджелудочной железе или мозгу. Режим дозирования будет определяться лечащим врачом и клиническими факторами. Как хорошо известно в области медицины, дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, включая размер пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное вводимое соединение, пол, время и способ введения, общее состояние здоровья и другие препараты, вводимые одновременно. Фармацевтически активное вещество может присутствовать в количестве от 0,1 нг до 10 мг/кг веса тела на дозу; однако предусмотрены дозы ниже или выше этого примерного диапазона, особенно с учетом вышеупомянутых факторов.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение обеспечивает одно или более соединений изобретения, раскрытым в настоящей заявке выше, для их применения в медицине.

Предпочтительным применением в медицине является ядерная медицина, такая как 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 обеспечивает соединение изобретения, как определено в настоящей заявке выше, для применения в способе диагностики и/или для определения стадии рака, предпочтительно рака предстательной железы. Рак предстательной железы является не единственным видом рака, который экспрессирует PSMA. Известно, что виды рака, не связанные с раком предстательной железы, демонстрируют экспрессию PSMA, включая рак молочной железы, рак легких, колоректальный рак и почечно-клеточная карцинома. Таким образом, любое описанное в настоящей заявке соединение, включающее PSMA-связывающий фрагмент, можно применять в диагностике, визуализации или лечении рака, имеющего экспрессию PSMA.

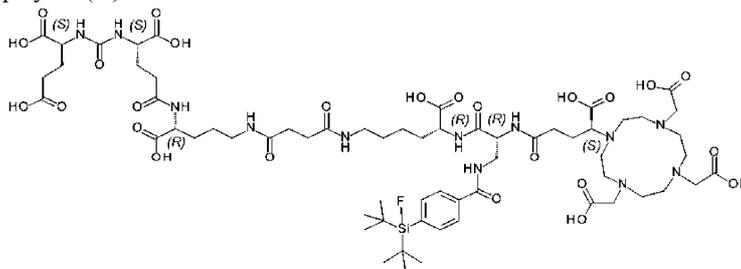
Предпочтительными показаниями являются обнаружение или определение стадии рака, такого как, помимо прочего, глиома высокой степени злокачественности, рак легких и особенно рак предстательной железы и метастазирующий рак предстательной железы, выявление метастатического заболевания у пациентов с первичным раком предстательной железы от промежуточного риска до высокого риска, и обнаружение метастатических участков даже при низких значениях ПСА в сыворотке у пациентов с биохимически рецидивирующим раком предстательной железы. Другим предпочтительным показанием является томографирование и визуализация неоангиогенеза.

С точки зрения медицинских показаний к лечению, особенно лучевой терапии, предпочтительным показанием является рак. Рак предстательной железы является особенно предпочтительным показанием.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение обеспечивает соединение изобретения, как определено в настоящей заявке выше, для применения в способе диагностики и/или для определения стадии рака, предпочтительно рака предстательной железы.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к следующим пунктам.

Соединение формулы (V)

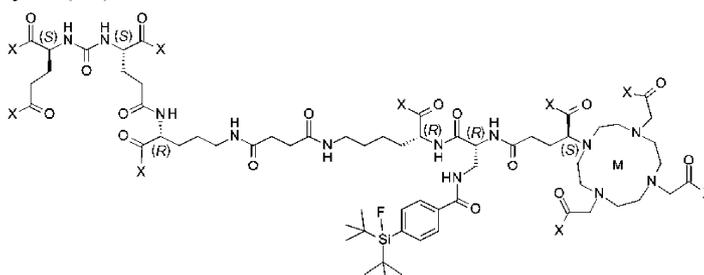


(V)

или его фармацевтически приемлемая соль, включающее хелатный радиоактивный катион, или где F необязательно представляет собой ^{18}F .

Соединение может включать хелатный катион, выбранный из катионов Sc, Cu, Ga, Y, In, Tb, Ho, Lu, Re, Pb, Bi, Ac, Eг и Th. Хелатный катион может быть радиоактивным. Хелатный радиоактивный катион может быть любым радиоактивным изотопом(ами) галлия, эрбия, меди, скандия, лютеция или иттрия.

Соединение формулы (Va)



(Va)

или его фармацевтически приемлемая соль, где каждый X независимо представляет собой OH или O⁻;

M представляет собой хелатный радиоактивный катион или отсутствует и

F необязательно представляет собой ¹⁸F.

В соединении формулы (Va) X может быть OH. X может быть O⁻. Одна или более групп X могут быть хелатированы с M, когда M присутствует.

В соединении формулы (Va) M может быть хелатным радиоактивным катионом. M может отсутствовать. M может быть радиоактивным катионом, хелатированным с одной или более X-группами. M может быть радиоактивным катионом, хелатированным с одним или более атомами азота. M может быть радиоактивным катионом, хелатированным с одним или более атомами N или одной или более группами X. M может быть радиоактивным катионом, хелатированным с одним или более атомами N и одной или более группами X.

В соединении формулы (V) или (Va) F может быть ¹⁸F. F может быть ¹⁹F.

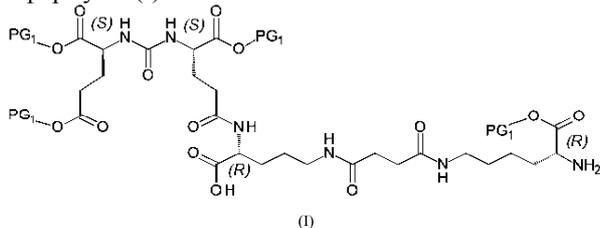
В соединении формулы (V) или (Va) хелатный радиоактивный катион может быть выбран из катионов ⁴³Sc, ⁴⁴Sc, ⁴⁷Sc, ⁵¹Cr, ^{52m}Mn, ⁵⁸Co, ⁵²Fe, ⁵⁶Ni, ⁵⁷Ni, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁶⁶Ga, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁸⁹Zr, ⁹⁰Y, ⁸⁹Y, менее Tc, ^{99m}Tc, ⁹⁷Ru, ¹⁰⁵Rh, ¹⁰⁹Pd, ¹¹¹Ag, ^{110m}In, ¹¹¹In, ^{113m}In, ^{114m}In, ^{117m}Sn, ¹²¹Sn, ¹²⁷Te, ¹⁴²Pr, ¹⁴³Pr, ¹⁴⁹Pm, ¹⁵¹Pm, ¹⁴⁹Tb, ¹⁵²Tb, ¹⁵⁵Tb, ¹⁶¹Tb, ¹⁵³Sm, ¹⁵⁷Gd, ¹⁶¹Tb, ¹⁶⁶Ho, ¹⁶⁵Dy, ¹⁶⁹Er, ¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb, ¹⁷²Tm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁹¹Pt, ¹⁹⁷Hg, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Au, ²¹²Pb, ²⁰³Pb, ²¹¹At, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²²³Ra, ²²⁵Ac, ²²⁷Th, катионной молекулы, включающей ¹⁸F, или катиона, такого как ¹⁸F-[AlF]²⁺; более предпочтительно катионов ⁴⁴Sc, ⁴⁷Sc, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁶⁸Ga, ⁹⁰Y, ¹¹¹In, ¹⁶¹Tb, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁸Re, ²¹²Pb, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²²⁵Ac и ²²⁷Th или катионной молекулы, включающей F. Хелатный радиоактивный катион может быть выбран из катионов Sc, Cu, Ga, Y, In, Tb, Ho, Lu, Re, Pb, Bi, Ac, Er и Th. Хелатный радиоактивный катион может быть Ga. Хелатный радиоактивный катион может быть Lu-177, Y-90 или Ac-225.

В соединении формулы (Va) M может быть выбран из катионов ⁴³Sc, ⁴⁴Sc, ⁴⁷Sc, ⁵¹Cr, ^{52m}Mn, ⁵⁸Co, ⁵²Fe, ⁵⁶Ni, ⁵⁷Ni, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁶⁶Ga, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁸⁹Zr, ⁹⁰Y, ⁸⁹Y, менее Tc, ^{99m}Tc, ⁹⁷Ru, ¹⁰⁵Rh, ¹⁰⁹Pd, ¹¹¹Ag, ^{110m}In, ¹¹¹In, ^{113m}In, ^{114m}In, ^{117m}Sn, ¹²¹Sn, ¹²⁷Te, ¹⁴²Pr, ¹⁴³Pr, ¹⁴⁹Pm, ¹⁵¹Pm, ¹⁴⁹Tb, ¹⁵²Tb, ¹⁵⁵Tb, ¹⁶¹Tb, ¹⁵³Sm, ¹⁵⁷Gd, ¹⁶¹Tb, ¹⁶⁶Ho, ¹⁶⁵Dy, ¹⁶⁹Er, ¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb, ¹⁷²Tm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁹¹Pt, ¹⁹⁷Hg, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Au, ²¹²Pb, ²⁰³Pb, ²¹¹At, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²²³Ra, ²²⁵Ac, ²²⁷Th, катионной молекулы, включающей ¹⁸F, или катиона, такого как ¹⁸F-[AlF]²⁺; более предпочтительно катионов ⁴⁴Sc, ⁴⁷Sc, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁶⁸Ga, ⁹⁰Y, ¹¹¹In, ¹⁶¹Tb, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁸Re, ²¹²Pb, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²²⁵Ac и ²²⁷Th или катионной молекулы, включающей ¹⁸F. M может быть выбран из катионов Sc, Cu, Ga, Y, In, Tb, Ho, Lu, Re, Pb, Bi, Ac, Er и Th. M может быть Ga. M может быть Lu-177, Y-90 или Ac-225.

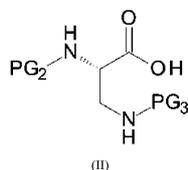
Выгодно синтезировать соединения с минимальным количеством изомеров. Хотя изомеры можно разделить, in-vivo применяется только один изомер, и, следовательно, неправильный изомер просто выбрасывается и не применяется. Таким образом, в идеале избегают условий, которые минимизируют рацемизацию или инверсию любого из определенных хиральных центров.

Также описан способ получения соединения, включающий стадии:

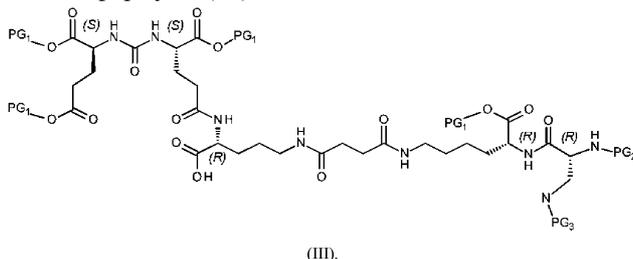
а) реакции соединения формулы (I)



с соединением формулы (II)



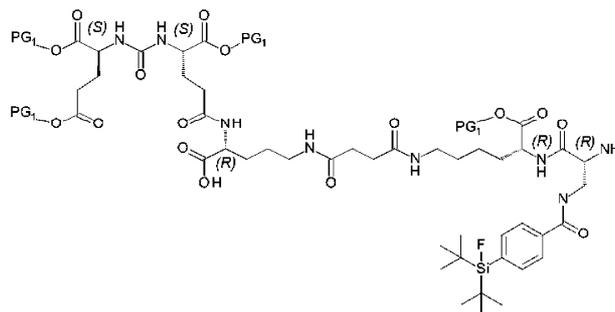
с образованием соединения формулы (III)



где PG¹ представляет собой tBu, PG² представляет собой Fmoc и PG³ представляет собой Dde;

и условия реакции включают применение основания, где основание представляет собой 2,4,6-коллидин или 2,6-диметилпиридин;

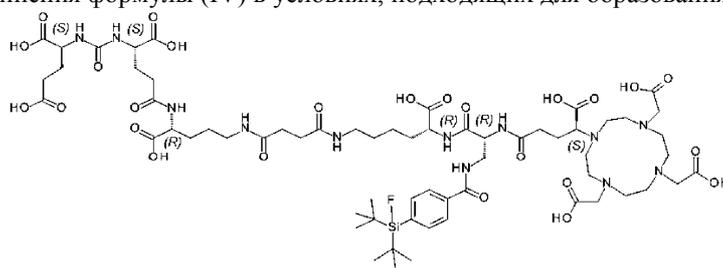
b) реакции соединения формулы (III) в условиях, подходящих для образования соединения формулы (IV)



(IV)

и

c) реакции соединения формулы (IV) в условиях, подходящих для образования соединения (V)

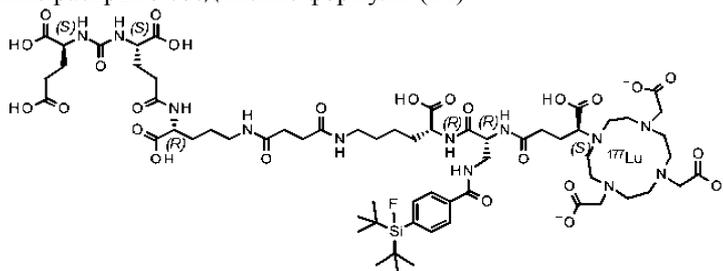


(V)

Согласно способу соединение (II) предварительно активируется реакцией с 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметиламиний тетрафторборатом (ТВТУ), 1-гидрокси-7-азабензотриазолом (НОАт) и 2,4,6-коллидином перед реакцией с соединением (I). Предварительная активация длится 5 мин или меньше.

Применение 2,4,6-коллидина или 2,6-диметилпиридина в качестве основания наряду с коротким временем активации помогает минимизировать рацемизацию активированного хирального соединения (II) по сравнению с другими азотистыми основаниями, такими как DIPEA. Более стерически затрудненное основание не извлекает кислотный протон на хиральном центре кислоты, следовательно, снижает рацемизацию перед связыванием с амином.

В настоящей заявке раскрыто соединение формулы (VI)

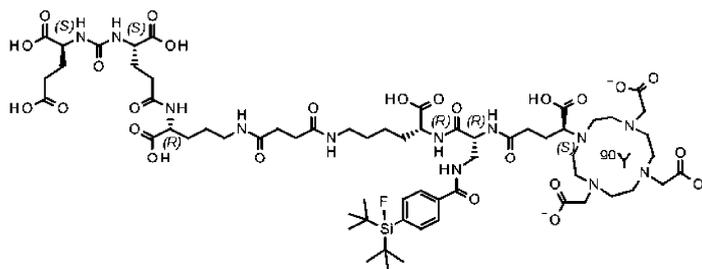


(VI)

или его фармацевтически приемлемая соль.

Там, где показан хелатный металл, кислотные группы, с которыми он хелатирован, просто условно показаны как COO^- , эквивалентная четвертая кислота также может быть частично хелатной и, следовательно, не может буквально быть COOH .

В настоящей заявке раскрыто соединение формулы (VII).



(VII)

или его фармацевтически приемлемая соль.

В настоящей заявке раскрыта фармацевтическая или диагностическая композиция, включающая соединение формулы (V) или (VI). Конъюгат, соединение или композиция могут применяться в качестве средства диагностики рака или визуализации.

Раскрыт способ визуализации и/или диагностики рака, включающий введение конъюгата, соединения или композиции в соответствии с формулой (V) или (VI) нуждающемуся в этом пациенту.

Раскрыт конъюгат, соединение или композиция формулы (V) или (VI) для применения в лечении рака.

Раскрыт конъюгат, соединение или композиция формулы (V) или (VI) для применения в диагностике, визуализации или профилактике неоангиогенеза/ангиогенеза.

Раскрыт конъюгат, соединение или композиция в соответствии с формулой (V) или (VI) для применения в качестве средства диагностики рака или визуализации или для применения в лечении рака, при котором рак представляет собой рак предстательной железы, рак молочной железы, рак легких, колоректальный рак или почечно-клеточная карцинома.

Чертежи иллюстрируют:

Фиг. 1: Примерная корреляция при определении девяти эталонных веществ в OriginPro 2016G.

Фиг. 2a: Контроль качества $[^{19}\text{F}][^{\text{nat}}\text{Ga}]$ -rhPSMA7-rac($[^{18}\text{F}][^{\text{nat}}\text{Ga}]$ D/L-Dap-R/S-DOTAGA-rhPSMA-7-rac), (партия 10, прекурсор для производства ($[^{18}\text{F}][^{\text{nat}}\text{Ga}]$ D/L-Dap-R/S-DOTAGA-rhPSMA-7 в отделении ядерной медицины, TUM). Условия HPLC: растворитель A: $\text{H}_2\text{O}+0,1\%$ TFA (трифторуксусная кислота); растворитель B: $\text{MeCN}+0,1\%$ (MeCN - ацетонитрил). TFA. Градиент: 25-35% B 0-40 мин, 95-95% B 40-45 мин, 35-35% B 45-50 мин; поток: 1 мл/мин, колонка: Nucleosil 100-5 C18, 125×4,6 мм. Образец: 1 мМ (DMCO (диметилсульфоксид)), 10 мкл.

Фиг. 2b: Распределение пиков: D-Dap-R-DOTAGA-rhPSMA-7.1; rhPSM7-rac с фиг. 2a вводили совместно с энантиочистым D-Dap-R-DOTAGA-rhPSMA-7.1. Условия для HPLC: Растворитель A: $\text{H}_2\text{O}+0,1\%$ TFA; Растворитель B: $\text{MeCN}+0,1\%$ TFA. Градиент: 25-35% B 0-40 мин, 95-95% B 40-45 мин, 35-35% B 45-50 мин; поток: 1 мл/мин, колонка: Nucleosil 100-5 C18, 125×4,6 мм, образец: 1 мМ (DMCO), 10 мкл.

Фиг. 2c: Профиль HPLC D-Dap-R-DOTAGA-rhPSMA-7.1; Условия для HPLC: Растворитель A: $\text{H}_2\text{O}+0,1\%$ TFA; Растворитель B: $\text{MeCN}+0,1\%$ TFA. Градиент: 25-35% B 0-40 мин, 95-95% B 40-45 мин, 35-35% B 45-50 мин; поток: 1 мл/мин, колонка: Nucleosil 100-5 C18, 125×4,6 мм, образец: 1 мМ (DMCO), 10 мкл.

Фиг. 3a: Распределение пиков: L-Dap-R-DOTAGA-rhPSMA-7.2; rhPSM7-rac с фиг. 2a вводили совместно с энантиочистым L-Dap-R-DOTAGA-rhPSMA-7.2. Условия для HPLC: Растворитель A: $\text{H}_2\text{O}+0,1\%$ TFA; Растворитель B: $\text{MeCN}+0,1\%$ TFA. Градиент: 25-35% B 0-40 мин, 95-95% B 40-45 мин, 35-35% B 45-50 мин; поток: 1 мл/мин, колонка: Nucleosil 100-5 C18, 125×4,6 мм, образец: 1 мМ (DMCO), 10 мкл.

Фиг. 3b: Профиль HPLC L-Dap-R-DOTAGA-rhPSMA-7.2; Условия для HPLC: Растворитель A: $\text{H}_2\text{O}+0,1\%$ TFA; Растворитель B: $\text{MeCN}+0,1\%$ TFA. Градиент: 25-35% B 0-40 мин, 95-95% B 40-45 мин, 35-35% B 45-50 мин; поток: 1 мл/мин, колонка: Nucleosil 100-5 C18, 125×4,6 мм, образец: 1 мМ (DMCO), 10 мкл.

Фиг. 4a: Распределение пиков: D-Dap-S-DOTAGA-rhPSMA-7.3; rhPSM7-rac с фиг. 2a вводили совместно с энантиочистым D-Dap-S-DOTAGA-rhPSMA-7.3. Условия для HPLC: Растворитель A: $\text{H}_2\text{O}+0,1\%$ TFA; Растворитель B: $\text{MeCN}+0,1\%$ TFA. Градиент: 25-35% B 0-40 мин, 95-95% B 40-45 мин, 35-35% B 45-50 мин; поток: 1 мл/мин, колонка: Nucleosil 100-5 C18, 125×4,6 мм, образец: 1 мМ (DMCO), 10 мкл.

Фиг. 4b: Профиль HPLC D-Dap-D-DOTAGA-rhPSMA-7.3; Условия для HPLC: Растворитель A: $\text{H}_2\text{O}+0,1\%$ TFA; Растворитель B: $\text{MeCN}+0,1\%$ TFA. Градиент: 25-35% B 0-40 мин, 95-95% B 40-45 мин, 35-35% B 45-50 мин; поток: 1 мл/мин, колонка: Nucleosil 100-5 C18, 125×4,6 мм, образец: 1 мМ (DMCO), 10 мкл.

Фиг. 5a: Распределение пиков: L-Dap-S-DOTAGA-rhPSMA-7,4; rhPSM7-rac с фиг. 2a вводили совместно с энантиочистым D-Dap-S-DOTAGA-rhPSMA-7.3. Условия для HPLC: Растворитель A:

H₂O+0,1% TFA; Растворитель В: MeCN+0,1% TFA. Градиент: 25-35% В 0-40 мин, 95-95% В 40-45 мин, 35-35% В 45-50 мин; поток: 1 мл/мин, колонка: Nucleosil 100-5 C18, 125×4,6 мм, образец: 1 мМ (DMCO), 10 мкл.

Фиг. 5b: Профиль HPLC L-Dap-D-DOTAGA-rhPSMA-7,4; Условия для HPLC: Растворитель А: H₂O+0,1% TFA; Растворитель В: MeCN+0,1% TFA. Градиент: 25-35% В 0-40 мин, 95-95% В 40-45 мин, 35-35% В 45-50 мин; поток: 1 мл/мин, колонка: Nucleosil 100-5 C18, 125×4,6 мм, образец: 1 мМ (DMCO), 10 мкл.

Фиг. 6a: Сродство связывания (IC₅₀ [нМ]) rhPSMA7.1 и 7.2 с PSMA. Сродство определяли с применением клеток LNCaP (150000 клеток/лунку) и ((4-[¹²⁵I] иодбензоил) KuE ([¹²⁵I]IB-KuE; c=0,2 нМ) в качестве радиолиганда (1 ч, 4°C, HBSS+1% BSA). Данные выражены как среднее ± стандартное отклонение (SD) (n=3, в трех различных экспериментах).

Фиг. 6b: Определение сродства связывания [нМ] изомеров rhPSMA7 с PSMA. Каждый из четырех столбцов показывает индивидуальные измерения сродства для rhPSMA7.1 (слева) к rhPSMA7.4 (справа). Условия описаны в легенде к фиг. 6a.

Фиг. 7: Изображение отдельных измерений IC₅₀ [нМ] показано на фиг. 6a и 6b. Значение № 5 из rhPSMA7.1 было удалено. Условия, описанные в легенде к фиг. 6a.

Фиг. 8: Изображение индивидуальных измерений интернализации [% от [¹²⁵I] IB-KuE]. Интернализованная активность (c=0,5 нМ) через 1 ч в % от контрольного лиганда ([¹²⁵I] I-BA) KuE (c=0,2 нМ), определенная на клетках LNCaP (37°C, DMEM F12 + 5% BSA, 125000 клеток/лунка). Данные скорректированы на неспецифическое связывание (10 мкмоль PMPA) и выражены как среднее ± стандартное отклонение (n=3).

Фиг. 9: Изображение индивидуальных измерений logP изомеров rhPSMA.

Фиг. 10: Биораспределение (в% ID/г (вводимая доза/г)) меченых ¹⁸F маркеров rhPSMA через 1 ч p.i у мышей SCID с опухолью LNCaP. Данные выражены как среднее ± 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).

Фиг. 11: Биораспределение [% ID/г] ¹⁸F-rhPSMAs, вводимых совместно с PMPA (8 мг/кг) через 1 ч p.i у мышей SCID с опухолью LNCaP. Данные выражены как среднее ± стандартное отклонение (n=3).

Фиг. 12: Возможные частицы, образованные метаболическим расщеплением амидных связей. iL: при расщеплении образуется частица с повышенной липофильностью; DF: дефторирование; nd: не обнаруживается, т.к. не радиоактивен.

Фиг. 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: экспериментальные данные подогнаны, внизу: отдельные пики после деконволюции.

Фиг. 14a: Количественная оценка относительных изменений (в% изменения введенной рацемической смеси) для оценки воспроизводимости классической интеграции (с помощью программы FIPLC) и деконволюции (с помощью "PeakFit") пика 4 (rhPSMA7.1). Оба способа демонстрируют одинаковую производительность для этого пика.

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

Фиг. 15: Процентное изменение каждого изомера rhPSMA7.1-7.4 в крови, печени, почках, опухолях и моче относительно его доли во введенном растворе ([¹⁸F] [^{nat}Ga] rhPSMA7-гас. Данные выражены в виде средних значений ± стандартное отклонение (n=4; см. также фиг. 16).

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

Фиг. 17: Слева: профиль сканера TLC (тонкослойная хроматография) для пластины для TLC с образцом печени (30.07.2018, общее количество cts: 142 cts). Из-за их плохой статистики и ограниченной достоверности датасеты с cts менее 200 были удалены. Справа: фотоизображение пластинки для TLC с образцом печени: длинный хвост движущегося индикатора.

Фиг. 18: Слева: профиль сканера TLC для пластинки для TLC с образцом контроля качества (01.08.2018, общее количество cts: 384). Справа: примерное фотоизображение пластинки для TLC с образцом мочи, почек, печени, опухоли, крови и QK.

Фиг. 19: Радио-TLC [F-18] rhPSMA7-гас (30.07.2018) в рамках контроля качества в отделении ядерной медицины перед клиническим применением индикатора. Обратите внимание, что след индикатора наблюдается даже в сформулированном буфере (и, следовательно, в отсутствие белков).

Фиг. 20: Количественное определение свободного [F-18]фторида и "интактного" [F-18]rhPSMA7-гас способом радио-TLC в образце мочи (30.07.2018).

Фиг. 21: Слева: Радио-HPLC анализ мочи, собранной и объединенной от 4 нормальных мышей, которым вводили соответствующий индикатор [F-18]rhPSMA7-х. Справа: Радио-HPLC анализ "холодной"

мочи, пропитанной соответствующим индикатором [F-18]rhPSAM-7.x в течение 1 ч (7.1., 7.2.), 0,5 ч (7.3.) и 2 ч (7.4.). Условия HPLC: Растворитель А: H₂O+0,1% TFA; Растворитель В: MeCN+0,1% TFA; градиент: 5% изократический 0-3 мин, 25-35% В 3-43 мин, 95-95% В 43-48 мин; поток: 1 мл/мин, колонка: Nucleosil 100-5 C18, 125×4,6 мм.

Фиг. 22: Разделение радиоактивных частиц в моче с помощью фиксации картриджа и FIPLC. Вверху: Радио-HPLC анализ мочи через 30 мин после введения [F-18]rhPSMA7.3 мышам, показывающий небольшую долю на 1,6 минуте и интактный индикатор на ок. 34,5 мин. Внизу (слева): моча мышей, через 30 мин после введения [F-18]rhPSMA7.3, была разбавлена и подвергнута фиксации на картридже STRATA-X. Картридж был промыт и элюирован MeCN/водой (60/40 в/в +1% TFA); был обнаружен только интактный индикатор. Внизу (справа): как прорыв после фиксации картриджа (не удерживаемые компоненты), так и фракция, окончательно элюированная MeCN/водой с картриджа, были проанализированы методом TLC (внизу, справа). Если в элюате картриджа было обнаружено 96,1% [F-18]rhPSMA7.3 и только 3,9% [F-18]фторида, то в прорыве картриджа было обнаружено обратное соотношение (3,4% [F-18]rhPSMA7.3 и только 96,6% [F-18]фторида).

Фиг. 23: К свежей и нерадиоактивной моче мышей добавляли [F-18] rhPSMA7.3, а затем 0,5 мкмоль холодного F-19-фторида; инкубация в течение 2ч. Радиоактивность была полностью (98,5%) преобразована в очень гидрофильную фракцию, представляющую [F-18] фторид (пик на 1,6 мин). Примечание: пик на 1,6 мин впоследствии был иммобилизован на картридже QMA и элюирован NaCl (1M) (= фторид).

Фиг. 24: Клиническое биораспределение и накопление в опухолевых поражениях ¹⁸F-rhPSMA-7 (слева) и ¹⁸F-rhPSMA-7.3 (справа), как продемонстрировано с помощью SUV_{макс} (SUV - стандартизированное значение накопления). Данные выражены как среднее ± стандартное отклонение.

Фиг. 25: Клиническое биораспределение и накопление в опухолевых поражениях ¹⁸F-rhPSMA-7 (слева) и ¹⁸F-rhPSMA-7.3 (справа), как показано с помощью SUV_{среднее}. Данные выражены как среднее ± стандартное отклонение.

Фиг. 26: Клиническое биораспределение и накопление в опухолевых поражениях ¹⁸F-rhPSMA-7 (слева) и ¹⁸F-rhPSMA-7.3 (справа), что продемонстрировано отношением БИУ_{макс} к фону. Данные выражены как среднее ± стандартное отклонение.

Фиг. 27: Клиническое биораспределение и накопление в опухолевых поражениях ¹⁸F-rhPSMA-7 (слева) и ¹⁸F-rhPSMA-7.3 (справа), как продемонстрировано отношением SUV_{среднее} к фону. Данные выражены как среднее ± стандартное отклонение.

Фиг. 28: Два клинических примера ПЭТ-визуализации ¹⁸F-rhPSMA-7.3.

Примеры иллюстрируют изобретение.

Пример 1. Материалы и методы

Fmoc-(9-флуоренилметоксикарбонил-) и все другие защищенные аналоги аминокислот были приобретены у Bachem (Бубендорф, Швейцария) или Iris Biotech (Марктредвиц, Германия). Полистирол на основе тритилхлорида (TCP) был получен от PepChem (Тюбинген, Германия). Chematech (Дижон, Франция) поставил хелаторы DOTA-GA-ангидрид, (R)-DOTA-GA (tBu) 4 и (S)-DOTA-GA (tBu) 4. Все необходимые растворители и другие органические реагенты были приобретены у компаний Alfa Aesar (Карлсруэ, Германия), Sigma-Aldrich (Мюнхен, Германия) или VWR (Дармштадт, Германия). Твердофазный синтез пептидов проводили вручную с применением устройства для встряхивания шприцев Intelli-Mixer (Neolab, Heidelberg, Германия). Аналитическую и препаративную обращенно-фазовую хроматографию высокого давления (RP-HPLC) выполняли с применением градиентных систем Shimadzu (Shimadzu Deutschland GmbH, Neufahrn, Германия), каждая из которых оснащена детектором SPD-20A UV/Vis (220 нм, 254 нм). Колонку Nucleosil 100 C18 (125×4,6 мм, размер частиц 5 мкм) (CS GmbH, Langerwehe, Германия) применяли для аналитических измерений при скорости потока 1 мл/мин. В тексте цитируются как конкретные градиенты, так и соответствующие времена удерживания t_R. Очистку препаративной HPLC проводили на колонке Multospher 100 RP 18 (250×10 мм, размер частиц 5 мкм) (CS GmbH, Langerwehe, Германия) при постоянной скорости потока 5 мл/мин. Аналитическую и препаративную радио-RP-HPLC выполняли с применением колонки Nucleosil 100 C18 (5 мкм, 125×4,0 мм) (CS GmbH, Langerwehe, Германия). Элюентами для всех операций HPLC служили вода (растворитель А) и ацетонитрил (растворитель В), оба включали 0,1% трифторуксусной кислоты. Масс-спектры с ионизацией электрораспылением для характеристики веществ получали на масс-спектрометре Express^L 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 синтеза

1) Твердофазный синтез пептидов по Fmoc-стратегии

Загрузка TCP-смолы (GP1)

Загрузка тритилхлоридной полистирольной (TCP) смолы с Fmoc-защищенной аминокислотой (AA) осуществлялась путем перемешивания раствора TCP-смолы (1,95 ммоль/г) и Fmoc-AA-OH (1,5 экв.) в безводной DCM с DIPEA (4,5 экв.) при комнатной температуре в течение 2 ч. Оставшийся тритилхлорид блокировали добавлением метанола (2 мл/г смолы) в течение 15 мин. Затем смолу фильтровали и промы-

вали DCM (2×5 мл/г смолы), DMF (2×5 мл/г смолы), метанолом (5 мл/г смолы) и сушили в вакууме. Конечная загрузка 1 Fmoc-AA-OH определялась по следующему уравнению:

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

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 строительного блока со связанным со смолой пептидом смесь TBTU и НОВТ применялась для предварительной активации DIPEA или 2,4,6-триметилпиридином в качестве основания в DMF (10 мл/г смолы) в течение 5 мин. Точная стехиометрия и время реакции для каждой стадии конъюгации указаны в протоколе синтеза. После реакции смолу промывали DMF (6×5 мл/г смолы).

Снятие защиты с Fmoc на смоле (GP3)

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

Снятие защиты Dde на смоле (GP4)

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

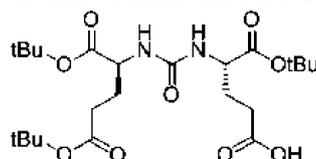
Отщепление пептида от смолы с одновременным снятием защиты с кислотолабильных защитных групп (GP5)

Полностью защищенный связанный со смолой пептид растворяли в смеси TFA/TIPS/вода (об/об/об; 95/2,5/2,5) и встряхивали в течение 30 мин. Раствор отфильтровывали и смолу обрабатывали таким же образом еще 30 мин. Оба фильтрата объединяли, перемешивали еще 5 ч и концентрировали в токе азота. После растворения остатка в смеси трет-бутанола и воды с последующей лиофилизацией 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 мин при 75°C пептид очищали с помощью RP-HPLC.

Синтез связывающего мотива PSMA Glu-мочевина-Glu((tBuO)EuE(OtBu)₂)



tBu-защищенный связывающий мотив Glu-мочевина-Glu (EuE) синтезировали в соответствии с ранее опубликованной процедурой (схема 1) для tBu-защищенного Glu-мочевина-Lys (EuK).

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

Раствор DCM, включающий 2,0 г (7,71 ммоль, 1,0 экв.) 1-ди-трет-бутил-L-глутамат HCl, охлаждали на льду в течение 30 мин, а затем обрабатывали 2,69 мл TEA (19,28 ммоль, 2,5 экв.) и 3,3 мг (0,3 ммоль, 0,04 экв.) DMAP. После дополнительного перемешивания в течение 5 мин медленно добавляли 1,38 г (8,84 ммоль, 1,1 экв.) 1,1'-карбонилдиимидазола (CDI), растворенного в DCM, в течение 30 мин. Реакционную смесь дополнительно перемешивали в течение ночи и давали ей нагреться до КТ. Реакцию останавливали, применяя 8 мл насыщенного NaHCO₃, с сопутствующими стадиями промывки водой (2x) и соляным раствором (2x) 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)-Ди-трет-бутил-2-(1H-имидазол-1-карбоксамидо) пентандиоата (i) растворяли в 1,2-дихлорэтаноле (DCE) и охлаждали на льду в течение 30 мин. К этому раствору добавляли 2,15 мл (15,42 ммоль, 2,0 экв.) TEA и 2,54 г (7,71 ммоль, 1,0 экв.) H-L-Glu (OBzl)-OtBu HCl, и перемешивали раствор в течение ночи при 40°C. Оставшийся растворитель выпаривали и неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле со смесью элюентов, включающей 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) полу-

чали в виде бесцветного масла.

(tBuO)EuE(OtBu)₂ (iii):

Чтобы синтезировать (tBuO)EuE(OtBu)₂ 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-глутамат (ii) растворяли в 75 мл EtOH, и в этот раствор добавляли 0,34 г (0,57 ммоль, 0,1 экв.) палладия на активированном угле (10%). Колбу, включающую реакционную 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%). HPLC (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]⁺.

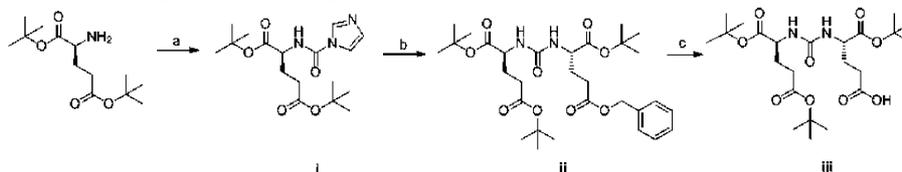


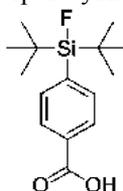
Схема 1. Синтез (tBuO)EuE(OtBu)₂:

a) DCI, TEA, DMAP (DCM);

b) H-L-Glu(OBzl)-OtBu HCl, TEA (DCE);

c) Pd/C (10%), H₂ (EtOH).

Синтез акцептора фторида кремния. 4-(ди-трет-бутилфторсилил) бензойная кислота (SiFA-BA)



SiFA-BA синтезировали по ранее опубликованной методике (схема 2). 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 DMF (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 ч. Затем смесь выливали в ледяную H₂O (250 мл) и экстрагировали Et₂O (5×50 мл). Объединенные органические фракции промывали нас. водн. NaHCO₃ (2×100 мл) и соевым раствором (100 мл), сушили, фильтровали и концентрировали в вакууме, получая неочищенный продукт, который очищали колоночной флэш-хроматографией (диоксид кремния, 5% EtOAc/бензин), получая i в виде бесцветного масла (7,18 г, 95%). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ [ppm] (млн⁻¹)=0,10 (6H, s, SiMe₂t-Bu), 0,95 (9H, s, SiMe₂tBu), 4,69 (2H, s, CH₂OSi), 7,21 (2H, d), 7,46 (2H,). HPLC (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 на магнитной мешалке 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 THF (15 мл). После перемешивания реакционной смеси в течение 30 мин при -78°C полученную суспензию по каплям в течение 30 мин добавляли к охлажденному (минус 78°C) раствору ди-трет-бутилдифторсилана (1,12 г, 6,23 ммоль, 1,2 экв.) в сухом THF (10 мл). Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры в течение 12 ч, 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 II в виде желтоватого масла (1,88 г, 95%). Его применяли для последующих реакций без дополнительной очистки. Спектры ЯМР соответствуют литературным данным^[2]. HPLC (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 ч 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 iii в виде желтоватого масла (1,29 г, 98%), которое затвердело. Продукт применяли без дополнительной очистки. Спектры ЯМР соответствуют литературным данным^[2]. HPLC (от 50 до 100% В за 15 мин): t_R=8,2 мин.

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

Раствор спирта ш (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 растворе дихлорметана (60 мл). После перемешивания реакционной смеси в течение 30 мин при 0°C и в течение 2,5 ч при комнатной температуре добавляли безводный диэтиловый эфир (40 мл) и надосадочный раствор декантировали с черного смолистого материала. Нерастворимый материал тщательно промывали диэтиловым эфиром, и объединенные органические фазы пропускали через короткий слой силикагеля (10 см на г сырого продукта) для фильтрации. Растворители удаляли в вакууме, получая альдегид iv в виде желтоватого масла (1,31 г, 96%). Спектры ЯМР соответствовали литературным данным^[2]. HPLC (от 50 до 100% В за 15 мин): $t_R=10,5$ мин.

4-(ди-трет-Бутилфторсилил)бензойная кислота (v):

При комнатной температуре 1М водный $KMnO_4$ (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 М NaH_2PO_4 буфер H_2O (20 мл) при pH 4,0-4,5. После перемешивания смеси в течение 25 мин ее охлаждали до 5°C, после чего добавляли избыток $KMnO_4$ (0,78 г, 4,92 ммоль, 1,0 экв.). Затем реакцию гасили добавлением насыщенного водного раствора Na_2SO_3 (50 мл). При добавлении 2М 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 Et_2O/n -гексана (1:3, в течение 12 ч), чтобы получить v (0,84 г, 60%). Спектры ЯМР соответствовали литературным данным^[2]. HPLC (от 50 до 100% В за 15 мин): $t_R=8,5$ мин.

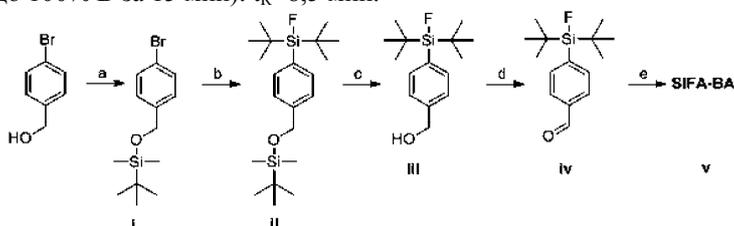


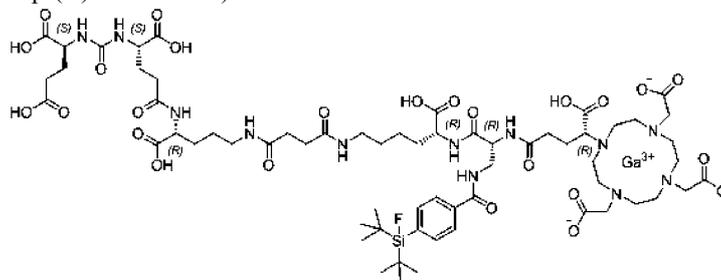
Схема 2 Синтез SiFA-BA:

- TBDMSCl, имидазол (DMF);
- tBuLi, ди-трет-бутилдифторсилан (THF);
- HCl (MeOH);
- хлорхромат пиридиния (DCM);
- $KMnO_4$ (DCM, трет-бутанол, буфер NaH_2PO_4).

Синтез rhPSMA-7.1-7.4

Первые стадии синтеза для 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 расщепления группы Fmoc 20% пиперидином в DMF (GP3), (tBuO) EuE (OtBu)₂ (2,0 экв.) конъюгировали с HOAt (2,0 экв.), TBTU (2,0 экв.) и DIPEA (6,0 экв.) в DMF в течение 4,5 ч. После отщепления Dde-группы смесью 2% гидразина в DMF (GP4a) добавляли раствор янтарного ангидрида (7,0 экв.) и DIPEA (7,0 экв.) в DMF и оставляли для реакции на 2,5 ч. Конъюгирование Fmoc-D-Lys (OtBu) HCl (2,0 экв.) достигалось добавлением к смоле смеси HOAt (2,0 экв.), TBTU (2,0 экв.) и DIPEA (6,0 экв.) в DMF. После предварительной активации в течение 5 мин добавляли Fmoc-D-Lys (OtBu) HCl (2,0 экв.), растворенный в DMF, и оставляли для реакции на 2,5 ч (GP2). Последующее расщепление Fmoc-группы проводили путем добавления смеси 20% пиперидина в DMF (GP3). Наконец, смолу расщепили для синтеза rhPSMA-7.1-7.4 (схема 3).

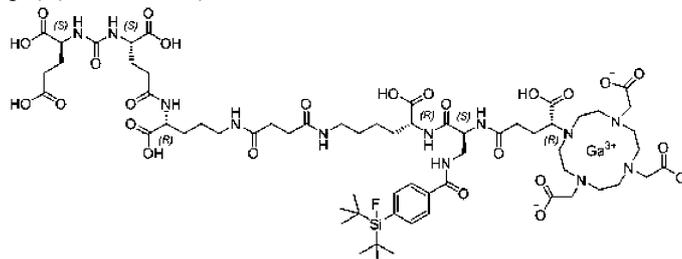
rhPSMA-7.1 (D-Dap-(R)-DOTA-GA):



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 DMF и добавляли к связанному со смолой пептиду на 2,5 ч. Последующую депротекцию ортогонального Dde проводили с применением имидазола и гидрохлорида гидроксилamina, растворенных в смеси NMP и DMF в течение 3 ч. SiFA-BA (1,5 экв.) реагировал со свободным амином боковой цепи с HOAt (1,5 экв.), TBTU (1,5 экв.) и DIPEA (4,5 экв.) в качестве реагентов активации в DMF в течение 2 ч. После снятия защиты с Fmoc пиперидином (GP3), (R)-DOTA-GA(tBu)₄

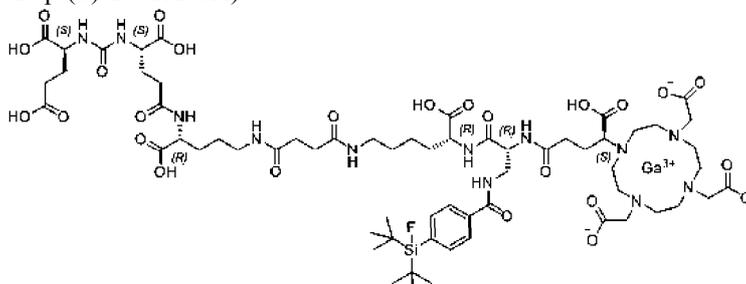
(2,0 экв.) конъюгировали с HOAT (2,0 экв.), TBTU (2,0 экв.) и 2,4,6-триметилпиридином (6,7 экв.) в DMF в течение 2,5 ч. Очистку от смолы с одновременной депротекцией кислотно-лабильных защитных групп проводили в TFA, согласно GP5. ^{nat}Ga -комплексобразование пептида проводили, как описано в GP6.

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



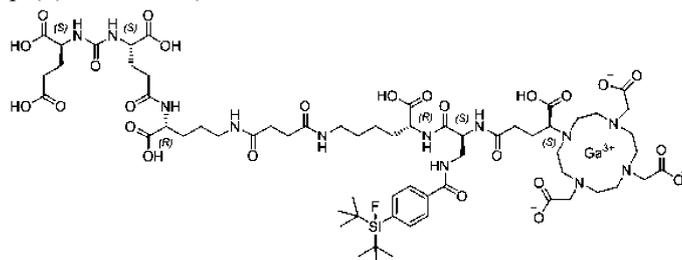
Фмос-L-Dap(Dde)-OH (2,0 экв.) предварительно активировали в смеси HOAt (2,0 экв.), TBTU (2,0 экв.) и 2,4,6-триметилпиридина (6,7 экв.) в DMF в течение 2,5 ч. После ортогональной депротекции Dde, конъюгацию SiFA-BA и Фмос-расщепление проводили, как описано для rhPSMA-7.1. (R)-DOTA-GA(tBu)₄ (2,0 экв.) конъюгировали с HOAT (2,0 экв.), TBTU (2,0 экв.) и 2,4,6-триметилпиридином (6,7 экв.) в DMF в течение 2,5 ч. Очистку от смолы с одновременной депротекцией кислотно-лабильных защитных групп проводили в TFA согласно GP5. ^{nat}Ga -комплексобразование пептида проводили, как описано в GP6.

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



Фмос-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 DMF в течение 2,5 ч. После ортогональной депротекции Dde, конъюгацию SiFA-BA и Фмос-расщепление проводили, как описано для rhPSMA-7.1. (S)-DOTA-GA(tBu)₄ (2,0 экв.) конъюгировали с HOAT (2,0 экв.), TBTU (2,0 экв.) и 2,4,6-триметилпиридином (6,7 экв.) в DMF в течение 2,5 ч. Очистку от смолы с одновременной депротекцией кислотно-лабильных защитных групп проводили в TFA согласно GP5. ^{nat}Ga -комплексобразование пептида проводили, как описано в GP6.

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



Фмос-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 DMF в течение 2,5 ч. После ортогональной депротекции Dde, конъюгацию SiFA-BA и Фмос-расщепление проводили, как описано для rhPSMA-7.1. (S)-DOTA-GA(tBu)₄ (2,0 экв.) конъюгировали с HOAT (2,0 экв.), TBTU (2,0 экв.) и 2,4,6-триметилпиридином (6,7 экв.) в DMF в течение 2,5 ч. Очистку от смолы с одновременной депротекцией кислотно-лабильных защитных групп проводили в TFA согласно GP5. ^{nat}Ga -комплексобразование пептида проводили, как описано в GP6.

rhPSMA-7.1:

HPLC (от 10 до 70% В за 15 мин): $t_R = 10,5$ мин.HPLC (от 25 до 35% В за 40 мин): $t_R = 31,4$ мин.

rhPSMA-7.2:

HPLC (от 10 до 70% В за 15 мин): $t_R = 10,4$ мин.HPLC (от 25 до 35% В за 40 мин): $t_R = 27,9$ мин.

rhPSMA-7.3:

HPLC (от 10 до 70% В за 15 мин): $t_R = 10,4$ мин.HPLC (от 25 до 35% В за 40 мин): $t_R = 28,1$ мин.

rhPSMA-7.4:

HPLC (от 10 до 70% В за 15 мин): $t_R = 10,5$ мин.HPLC (от 25 до 35% В за 40 мин): $t_R = 29,1$ мин.

rhPSMA-7.1-7.4:

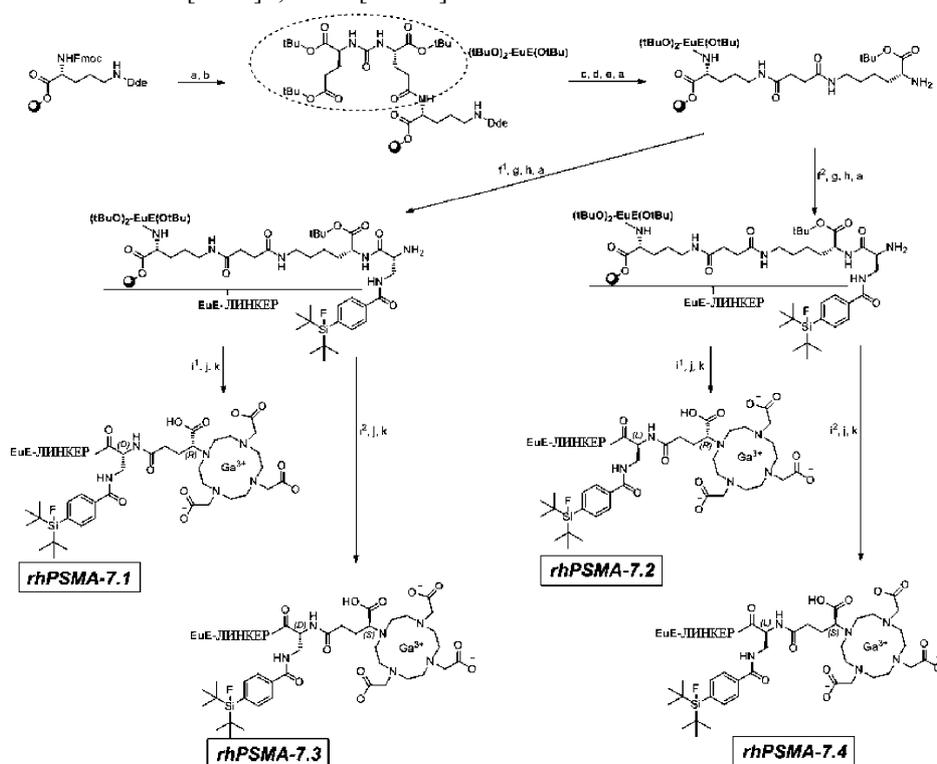
Расчетная моноизотопная масса ($C_{63}H_{96}F_{Ga}N_{12}O_{25}Si$): 1536.6найдено: $m/z = 1539.4 [M+H]^+$, $770.3 [M+2H]^{2+}$.

Схема 3. Синтез rhPSMA-7.1-7.4: а) 20% пиперидин, (DMF); б) $(tBuO)_2EuE(OtBu)_2$, HOAt, TBTU, DIPEA, (DMF); в) 2% гидразин (DMF); д) янтарный ангидрид, DIPEA, (DMF); е) Fmoc-D-Lys(OtBu)-HCl, HOAt, TBTU, DIPEA, (DMF); f^1) Fmoc-D-Dap(Dde)-OH, HOAt, TBTU, 2,4,6-коллидин, (DMF); f^2) Fmoc-L-Dap(Dde)-OH, HOAt, TBTU, 2,4,6-коллидин, (DMF); г) имидазол, гидроксиламин гидрохлорид, (NMP, DMF); h) SiFA-BA, HOAt, TBTU, DIPEA (DMF); i^1) (R)-DOTA-GA(tBu)₄, HOAt, TBTU, 2,4,6-коллидин (DMF); i^2) (S)-DOTA-GA(tBu)₄, HOAt, TBTU, 2,4,6-коллидин (DMF); j) очистка и депротекция: TFA, TIPS, H₂O; k) Ga(NO₃)₃, (tBuOH, H₂O). ¹⁸F-мечение

Для ¹⁸F-мечения применялась ранее опубликованная процедура, которая была немного изменена. Вкратце, водный F⁻ пропускали через картридж SAX (Sep-Pak Accell Plus QMA Carbonate light), который предварительно кондиционировали 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⁺⊂2.2.2]OH⁻, растворенного в 500 мкл безводного ацетонитрила. Перед мечением добавляли 30 мкмоль щавелевой кислоты в безводном ацетонитриле (1 М, 30 мкл). Эту смесь применяли целиком или аликвоту для фторирования 10-25 нмоль PSMA-SiFA (1 мМ в безводном ДМСО). Полученную реакционную смесь инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Для очистки индикатора применяли легкий картридж Sep-Pak C18, предварительно кондиционированный 10 мл EtOH, затем 10 мл H₂O. Меченую смесь разбавляли 9 мл PBS (pH 3) и пропускали через картридж, затем 10 мл H₂O. Пептид вымывался 500 мкл смеси 4:1 (v/v) EtOH в воде. Радиохимическую чистоту меченого соединения определяли методом радио

RP-HPLC и радио-TLC (силикагель 60 RP-18 F254S, подвижная фаза: 3:2 смесь (v/v) MeCN в H₂O, дополненная 10% 2 М водного NaOAc и 1% TFA).

¹²⁵I-мечение:

Эталонный лиганд для исследований *in vitro* ([¹²⁵I] I-BA) CuE получали в соответствии с ранее опубликованной процедурой. Вкратце, 0,1 мг станилированного предшественника (SnBu₃-BA)(OtBu)CuE(OtBu)₂ растворяли в растворе, включающем 20 мкл перуксусной кислоты, 5,0 мкл (21 МБк) [¹²⁵I]NaI (74 ТБк/ммоль, 3,1 ГБк./мл, 40 мМ 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 TFA в течение 30 мин с последующим выпариванием TFA. Неочищенный продукт ([¹²⁵I]I-BA) CuE очищали с помощью RP-HPLC (от 20% до 40% В за 20 мин): t_R = 13,0 мин.

Эксперименты *in vitro*

Определение IC₅₀

PSMA-позитивные клетки LNCaP выращивали в среде Игла, модифицированной Дублекко/питательной смеси F-12 с глутамаксом-1 (1:1) (Invitrogen), с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки и поддерживали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂. Для определения сродства PSMA (IC₅₀) клетки собирали за 24±2 ч до эксперимента и высевали в 24-луночные планшеты (1,5×10⁵ 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 (BSA)) и оставляли на 15 мин на льду для уравнивания в 200 мкл HBSS (1% BSA). Затем добавляли 25 мкл на лунку растворов, включающих либо HBSS (1% BSA, контроль), либо соответствующий лиганд в возрастающей концентрации (10⁻¹⁰-10⁻⁴ М в HBSS, с последующим добавлением 25 мкл ([¹²⁵I]I-BA) CuE (2,0 нМ) в HBSS (1% BSA). 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 М NaOH и объединяли с 200 мкл HBSS на следующем этапе промывки. Количественное определение связанного и свободного радиолиганда проводилось в γ-счетчике.

Интернализация

Для исследований интернализации клетки LNCaP собирали за 24±2 ч до эксперимента и высевали в 24-луночные планшеты (1,25×10⁵ клеток в 1 мл/лунку). После удаления культуральной среды клетки промывали один раз 500 мкл DMEM-F12 (5% BSA) и оставляли для уравнивания не менее 15 мин при 37°C в 200 мкл DMEM-F12 (5% BSA). Каждую лунку обрабатывали или 25 мкл DMEM-F12 (5% BSA), или 100 мкМ раствора РМРА для блокировки. Затем добавляли 25 мкл меченого ⁶⁸Ga/¹⁸F ингибитора PSMA (5,0 нМ) 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 этапов объединяли, представляя количество свободного радиолиганда. Удаление поверхностно связанной активности осуществляли путем инкубации клеток с 250 мкл ледяного раствора РМРА (10 мкМ в PBS) в течение 5 мин и снова промывали еще 250 мкл ледяного PBS. Интернализованную активность определяли путем инкубации клеток в 250 мкл 1 М NaOH и комбинации с фракцией последующей стадии промывки с 250 мкл 1,0 М NaOH. Каждый эксперимент (контроль и блокировка) проводили в трех повторностях. Свободную, поверхностно-связанную и интернализованную активность количественно определяли с помощью γ-счетчика. Все исследования интернализации сопровождалось эталонными исследованиями с применением ([¹²⁵I]I-BA) CuE (c=0,2 нМ), которые выполнялись аналогично. Данные были скорректированы на неспецифическую интернализацию и нормализованы к специфической интернализации, наблюдаемой для радиоактивного йодированного эталонного соединения.

Коэффициент разделения октанол-вода

Приблизительно 1 МБк меченого индикатора 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 мин при комнатной температуре флакон центрифугировали при 15000 g в течение 3 мин (Biofuge 15, Heraeus Sepatech, Osterode, Германия) и аликвоты по 100 мкл обоих слоев измеряли на гамма-счетчике. Эксперимент повторяли не менее шести раз.

Связывание с HSA

Для определения связывания HSA применяли колонку Chiralpak HSA (50×3 мм, 5 мкм, H13H-2433) при постоянной скорости потока 0,5 мл/мин. Подвижная фаза (А: NH₄OAc, 50 мМ в воде, pH 7 и В: изопропанол) готовили непосредственно для каждого эксперимента 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-

пропанола и 50% 50 мМ ацетатного буфера аммония pH 6,9. Выбранные эталонные вещества демонстрировали 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, применяемые для калибровки колонки с HSA

Эталон	t_R	Log t_R	Лит. HSA%	Log K HSA
п-бензиловый спирт	2,40	0,38	13,15	минус 0,82
Анилин	2,72	0,43	14,06	минус 0,79
Фенол	3,28	0,52	20,69	минус 0,59
Бензойная кислота	4,08	0,61	34,27	минус 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; время удерживания t_R ; Лит. Литературное значение HSA связывания человеческого сывороточного альбумина в [%]; Log K HSA логарифмический K связывания человеческого сывороточного альбумина.

Эксперименты in vivo

Все эксперименты на животных проводились в соответствии с общими правилами защиты животных в Германии и институциональными рекомендациями по уходу и применению животных. Для создания ксенотрансплантатов опухоли клетки LNCaP (10^7 клеток/200 мкл) суспендировали в смеси 1:1 (об/об) модифицированной Дульбекко среды Игла/питательной смеси F-12 с глутамаксом-1 (1:1) и матригелем (BD Biosciences, Германия) и подкожно прививали на правое плечо 6-8-недельным мышам CB17-SCID (Charles River, Sulzfeld, Германия). Мышей использовали, когда опухоли выросли до диаметра 5-8 мм (3-4 недели после инокуляции).

Биораспределение

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

Исследования метаболизма

а) Аналитическая установка

Аналитическую обращенно-фазовую хроматографию высокого давления (RP-HPLC) выполняли с применением градиентных систем Shimadzu (Shimadzu Deutschland GmbH, Neufahrn, Германия), оснащенных детектором SPD-20A UV/Vis (220 нм, 254 нм). Колонку Multospher 100 RP18 (125×4,6 мм, размер частиц 5 мкм) (CS GmbH, Langerwehe, Германия) применяли для аналитических измерений при скорости потока 1 мл/мин. Элюентами для всех операций HPLC были вода (растворитель А) и ацетонитрил (растворитель В), оба включали 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 HPLC составлял: 5% В изократический 0-3 мин, 25-35% В 3-43 мин, 95-95% В 43-48 мин.

Для радиотонкослойной хроматографии применялись алюминиевые листы, покрытые силикагелем 60 RP-18 F₂₅₄ с подвижной фазой, состоящей из смеси 3:2 (об/об) MeCN в H₂O с добавлением 10% 2 М водного NaOAc. и 1% TFA. Анализ выполняли с применением радио-TLC детектора Scan-RAM (LabLogic Systems Ltd., Шеффилд, Великобритания) или фосфорного сканера CR 35 BIO (Duerg Medical GmbH, Битигхайм-Биссинген, Германия).

б) Определение метаболической стабильности rhPSMA-7.1-7.4.

Для исследований микрометаболизма in vivo 8-12 МБк (менее 0,6 нмоль) соответствующего ^{18}F -меченного лиганда (rhPSMA-7,1-7,4) вводили в хвостовую вену самок здоровых мышей CB17-SCID (n=4). Мышей оставляли под анестезией на 30 минут 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-HPLC в вышеупомянутых условиях. Чтобы продемонстрировать, что изотопный обмен F на связанный с пептидом F имеет место в моче, каждое соединение инкубировали в течение определенных интервалов времени с образцами мочи здоровых самок мышей CB-17-SCID, которые анализировали с помощью радио-HPLC и/или радио-TLC. Кроме того, этот эксперимент проводили с добавлением избытка Na¹⁹F (0,5 мкмоль) и инкубацией в течение 2 ч с меченым ^{18}F rhPSMA-7.3.

с) Определение распределения rhPSMA-7.1-7.4 in vivo

Для количественной оценки относительного поглощения каждого изомера (rhPSMA-7.1-7.4) самцу мыши CB-17-SCID с опухолью вводили рацемическую смесь rhPSMA-7 (180-280 МБк, $S_A = 247-349$ ГБк/мкмоль, произведено в Klinikum rechts der Isar по полностью автоматизированной процедуре). Животное оставляли под анестезией на 30 мин и умерщвляли. Мочу, кровь, печень, почки и опухоль собирали и обрабатывали в соответствии с описанными ниже процедурами. Образец мочи центрифугировали в течение 5 минут при 9000 об/мин, чтобы получить прозрачный раствор, и непосредственно подвергали анализу с помощью радио-HPLC. Кровь разбавляли до 1 мл H_2O и дважды центрифугировали при 13000 г в течение 5 мин. Супернатант собирали и загружали в картридж Strata X (33 мкм полимерная обращенная фаза, 500 мг, предварительно кондиционированные 5 мл MeOH, а затем 5 мл H_2O). После промывки 5 мл H_2O картридж элюировали смесью 6:4 (об/об) MeCN в H_2O с добавлением 1% TFA. Элюат разбавляли водой и анализировали радио-HPLC. Опухоль, почки и печень гомогенизировали с применением измельчителя тканей Potter-Elvehjem (Kontes Glass Co, Vineland, США) или шаровой мельницы MM-400 (Retsch GmbH, Naan, Германия).

I) Измельчитель тканей Potter-Elvehjem

Опухоль и почки отдельно гомогенизировали в гомогенизаторе тканей с 1 мл буфера для экстракции (850 мкл 1 М HEPES pH 7,4, 100 мкл 20 мМ PMPA и 100 мкл 1 М NaCl) в течение 30 мин. Полученный гомогенат собирали и центрифугировали при 13000 г в течение 5 мин. Впоследствии супернатант собирали, снова центрифугировали (13000 г, 5 мин) и загружали в картридж Strata X (полимерная обращенная фаза 33 мкм, 500 мг, предварительно кондиционированные 5 мл MeOH, а затем 5 мл H_2O). После промывки 5 мл H_2O картридж элюировали смесью 6:4 (об/об) MeCN в H_2O с добавлением 1% TFA. Элюат каждого органа разбавляли водой и анализировали радио-HPLC.

II) Шаровая мельница MM-400

Органы (опухоль, почка, печень) отдельно гомогенизировали в 2 мл пробирке вместе с 3 мелющими шарами (диаметром 3 мм) и 1 мл буфера для экстракции (850 мкл 1 М HEPES pH 7,4, 100 мкл 20 мМ PMPA и 100 мкл 20 мМ PMPA и 100 мкл 1М NaCl) в течение 10 мин при 30 Гц. Гомогенат центрифугировали при 13000 г 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 мин при 30 Гц. После центрифугирования (13000 г, 5 мин) оба супернатанта объединяли и загружали в картридж Strata X (33 мкм полимерная обращенная фаза, 500 мг, предварительно кондиционированные 5 мл MeOH, а затем 5 мл H_2O). После промывки 5 мл H_2O картридж элюировали смесью 6:4 (об/об) MeCN в H_2O с добавлением 1% TFA. Элюат каждого органа разбавляли водой и анализировали радио-HPLC. Чтобы продемонстрировать, что прорыв во время загрузки картриджа не является результатом несвязанного F-18, супернатант также исследовали с помощью радио-TLC после центрифугирования.

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

Пример 2. Результаты

Распределение пиков хроматографии

Распределение хроматографических пиков проводилось путем сравнения УФ-профилей

а) смеси rhPSMA7-rac со

б) смесью rhPSMA7-rac, вводимой совместно с каждым энантиоочистым соединением rhPSMA7.

Для различных изомеров применялись следующие названия:

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

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

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

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

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

Таблица 2. Назначение различных изомеров, наименования, типичные времена удерживания (условия HPLC приведены на фиг. 2а-4б, а также процентное включение каждого изомера в типичной смеси rhPSAM7-гас. Точное количество может варьироваться для каждого изомера.

Лиганд	Наименование	t _R [мин]	Типичный процент от всей смеси
[¹⁹ F][^{nat} Ga]D-Dap-R-DOTAGA-rhPSMA7	rhPSMA-7-1	31,6	21
[¹⁹ F][^{nat} Ga]L-Dap-R-DOTAGA-rhPSMA7	rhPSMA-7-2	28,3	22
[¹⁹ F][^{nat} Ga]D-Dap-S-DOTAGA-rhPSMA7	rhPSMA-7-3	28,9	37
[¹⁹ F][^{nat} Ga]L-Dap-S-DOTAGA-rhPSMA7	rhPSMA-7-4	30,1	20

Сродство к связыванию

Первый набор значений (rhPSMA-7.1 и rhPSMA-7.2; фиг. 6а) определяли, применяя для серии разведения раствор, непосредственно полученный после ^{nat}Ga-комплексобразования соответствующего лиганда. Во втором наборе данных (Фиг. 6б) комплексобразованные лиганды очищали способом RP-HPLC для отделения некомплексобразованных солей ^{nat}Ga. Поскольку существенных различий не наблюдалось, обе серии были объединяли и применяли для расчета средних значений (±SD).

Таблица 3. Изображение отдельных измерений IC₅₀ [нМ] (как показано на фиг. 6а и 6б).

Условия описаны в описании к фиг. 6а.

№	rhPSMA7.1	rhPSMA7.2	rhPSMA7.3	rhPSMA7.4
1	8,74	3,17	нд	нд
2	6,91	2,97	нд	нд
3	7,27	3,36	нд	нд
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	нд
Среднее	6,85	3,70	4,37	3,62
SD	1,36	1,01	1,14	0,65

* Значение № 5 серии rhPSMA7.1 было удалено (статистический выброс).

Таблица 4. Сродство к связыванию (IC₅₀ [нМ]) других выбранных ингибиторов PSMA (*).

№	Ингибитор	IC ₅₀ [нМ]
1	(I-BA)KuE	7,1 ± 2,4 нМ
2	DCFPyL	12,3 ± 1,2 нМ
3	DKFZ1007	4,2 ± 0,5 нМ

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

Исследования интернализации

Таблица 5. Изображение индивидуальных уровней интернализации [% от [¹²⁵I] 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	69,55	191,83	161,41	207,33
SD	5,19	15,54	8,88	4,06

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

№	Ингибитор	Интернализация [%]
1	PSMA-1007	118 ± 4
2	DCFPyL	118 ± 5

проведено в нашей лаборатории с применением идентичного анализа связывания (Robu et al. EJM-
MMI Research 2018; 8:30).

Липофильность (коэффициент распределения октанол-вода)

Определение значений logP проводили в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS, pH 7,4) и н-октаноле (= logP_{окт/PBS}).

Таблица 7. Индивидуальные измерения log P для изомеров 7,1-7,4 rhPSMA7, определенные в смесях октанол/PBS_{7,4}

	rhPSMA7.1	rhPSMA7.2	rhPSMA7.3	rhPSMA7.4	rhPSMA7- rac
1	минус 2,79	минус 3,00	минус 3,03	минус 3,09	минус 3,23
2	минус 2,82	минус 3,01	минус 3,08	минус 3,12	минус 3,15
3	минус 2,80	минус 3,00	минус 3,07	минус 3,06	минус 3,17
4	минус 2,84	минус 3,00	минус 3,02	минус 3,07	минус 3,10
5	минус 2,88	минус 3,03	минус 3,06	минус 3,10	минус 3,17
6	минус 2,90	минус 2,96	минус 3,07	минус 3,04	минус 3,24
7	минус 2,85	минус 2,94	минус 3,06	минус 2,99	минус 3,80
8	минус 2,86	минус 2,89	минус 2,86	минус 2,97	минус 3,60
9	минус 3,14	минус 3,02	минус 3,39	минус 3,37	минус 3,87
10	минус 3,29	минус 3,02	минус 3,33	минус 3,43	минус 3,61
11	минус 3,26	минус 3,06	минус 3,34	минус 3,29	минус 3,76
12	минус 3,02	минус 3,02	минус 3,34	минус 3,48	минус 3,65
13	минус 3,15	минус 2,99	минус 3,20	минус 3,52	минус 3,67
14	минус 3,57	минус 3,02	минус 3,39	минус 3,50	-
15	минус 3,40	минус 3,06	минус 3,40	минус 3,44	-
16	минус 3,32	минус 3,14	минус 3,41	минус 3,41	-
17	минус 3,64	минус 3,40	минус 3,48	минус 3,56	-

18	минус 3,92	минус 3,50	минус 3,49	минус 3,61	-
19	-	минус 3,45	минус 3,32	минус 3,58	-
20	-	минус 3,45	минус 3,45	минус 3,54	-
21	-	минус 3,53	минус 3,53	минус 3,42	-
22	-	минус	минус 3,43	минус 3,57	-
23	-	-	минус 3,56	минус 3,67	-
Среднее	минус 3,14	минус 3,13	минус 3,26	минус 3,33	минус 3,46
SD	0,34	0,22	0,19	0,22	0,29

Таблица 8. Значения log P изомеров PSMA-1007, DCFPYL, rhPSMA7-гас и rhPSAM7.1-7.4; (n=6), октанол/PBS_{7,4}.

Ингибитор	log P
PSMA-1007	минус 1,6
DCFPyL	минус 3,4
^{nat} Ga- ¹⁸ F-rhPSMA7-гас, ⁶⁸ Ga- ^{nat} F-rhPSMA7-гас	минус 3,46±0,29
^{nat} Ga- ¹⁸ F-rhPSMA7.1	минус 3,14±0,34
^{nat} Ga- ¹⁸ F-rhPSMA7.2	минус 3,13±0,22
^{nat} Ga- ¹⁸ F-rhPSMA7.3	минус 3,26±0-19
^{nat} Ga- ¹⁸ F-rhPSMA7.4	минус 3,33±0022

Связывание ингибиторов PSMA с белком плазмы человека (HSA)

Таблица 9. Связывание HSA изомеров PSMA-1007, DCFPYL, rhPSMA7-гас и rhPSAM7.1-7.4; (n=6).
Определено на колонке Chiralpak HSA (50×3 мм, 5 мкм, H13H-2433)

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

Биораспределение [¹⁸F][^{nat}Ga] rhPSMA7.1-7.4 через 1 ч после введения
 Таблица 10. Биораспределение (в% ID/г) ¹⁸F-rhPSMA через 1 ч после введения мышам SCID с опухолью LNCaP. Данные выражены как среднее±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-гac).

	[¹⁸ F][^{nat} Ga]-rhPSMA-7-1	[¹⁸ F][^{nat} Ga]-rhPSMA-7-2	[¹⁸ F][^{nat} Ga]-rhPSMA-7-3	[¹⁸ F][^{nat} Ga]-rhPSMA-7-4	[¹⁸ F][^{nat} Ga]-rhPSMA-rac
Кровь	0,53±0,13	0,56±0,20	0,96±0,24	1,15±0,30	1,1±0,03
Сердце	0,53±0,03	0,32±0,13	0,87±0,17	0,71±0,26	0,69±0,07
Легкое	1,1±0,21	0,89±0,38	2,2±0,35	1,59±0,61	1,4±0,17
Печень	0,75±0,62	0,35±0,08	0,69±0,13	0,69±0,20	0,67±0,07
Селезенка	20,0±4,2	10,1±6,3	16,6±2,6	18,4±9,77	11,1±2,3
Поджелуд. 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
Мышцы	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 [¹⁸F][^{nat}Ga]rhPSMA7.1-7.4 через 1 ч после введения с конкуренцией
 Таблица 11. Биораспределение [%ID/г] меченых ¹⁸F индикаторов rhPSMA, совместно введенных с РМРА (8 мг/кг) через 1 ч после введения мышам SCID с опухолью LNCaP.

Данные выражены как среднее±стандартное отклонение (n=3).

	[¹⁸ F][^{nat} Ga]-rhPSMA-7-1	[¹⁸ F][^{nat} Ga]-rhPSMA-7-2	[¹⁸ F][^{nat} Ga]-rhPSMA-7-3	[¹⁸ F][^{nat} 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
Поджелуд. 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
Мышцы	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 rhPSMA 7.x в крови, почке, печени, моче и опухоли после применения [¹⁸F] rhPSMA 7-гac

С целью количественной оценки относительных изменений каждого изомера rhPSMA7 в крови, печени, почках, моче и опухоли через 30 мин после инъекции [¹⁸F]rhPSMA7-гac мышам, несущим опухоль LNCaP, применяются два разных способа гомогенизации (измельчения и шаровой мельницы) для извлечения индикатора из ткани почек, печени и опухоли (см. Материалы и методы).

В табл. 12 обобщены наблюдаемые эффективности обоих способов гомогенизации и эффективность последующей процедуры твердофазной экстракции (для отделения индикатора от белковой фракции).

Таблица 12. Определение скорректированных по распаду экстрагированных активностей из исследуемых образцов ткани с помощью измельчителя тканей Potter-Elvehjem (n=1) и шаровой мельницы MM-400 (n=3).

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

В то время как извлечение активности из образцов с помощью измельчителя тканей было довольно эффективным, применение шаровой мельницы разочаровало. Тем не менее, даже с шаровой мельницей была достигнута эффективность извлечения более 60%.

Принимая во внимание возможные частицы, которые могут образовываться в результате метаболического расщепления амидных связей rhPSMA7, вероятными представляются только а) частицы со значительно увеличенной липофильностью б) F18-фторид. Таким образом, в принципе кажется возможным, что частицы "iL", изображенные на фиг. 12, не извлекаются из образца ткани (водная экстракция) и, таким образом, не появляются в окончательном анализе.

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

Для количественного определения каждого изомера в рацемической смеси и особенно для плохо разделенных первого и второго пиков (rhPSMA 7.2 и rhPSMA7.3) первоначально применялось графическое приближенное значение. Этот подход был основан на предположении, что а) каждый изомер элюируется из колонки для HPLC 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 rhPSMA7.3).

Основываясь на этих предположениях, первый анализ выполняли с применением одной мыши с опухолью LNCaP, которой одновременно вводили [¹⁸F][^{nat}Ga]rhPSMA7-рас. 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 с помощью процедур деконволюции, применяющих гауссову функцию отклика с алгоритмом деконволюции/фильтрации Фурье (<https://systatsoftware.com/products/peakfit/>).

Сравнение графического анализа первых экспериментов показало, что графический анализ переоценил второй пик (rhPSMA7.3), тогда как первый пик был недооценен. Следовательно, все наборы данных повторно проанализировали и количественно оценили с помощью PeakFit.

HPLC-анализ 4 независимых экспериментов на мышях с опухолями через 30 мин после введения

Оценка пиков 3 и 4 (rhPSMA7.4 и rhPSMA 7.1) с помощью радио-HPLC

Сначала проверили, 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).

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

Фиг. 14а и 14б обобщают процентное изменение каждого изомера rhPSAM7.n в данном образце по отношению к его процентному включению во введенном растворе ($[^{18}\text{F}][^{\text{nat}}\text{Ga}]\text{rhPSMA7-gac}$); результаты для отдельного эксперимента показаны на фиг. 14. Долю каждого изомера определяли количественно путем анализа профиля элюции FIPLC с помощью Systat PeakFit'. Затем рассчитывали процентное изменение каждого изомера в данном образце по отношению к его процентному включению во введенный раствор.

Обсуждение данных FIPLC

Радио-HPLC анализ радиоактивности, экстрагированной 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 наблюдалось. Следует отметить, что F-18-фторид не может быть точно обнаружен с помощью FIPLC в условиях, применяемых для пробоподготовки (см. анализ TLC).

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

Хотя rhPSMA7.1 имеет самое слабое сродство и интернализацию из всех соединений rhPSMA7, он 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, индикаторы 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 $69,55\% \pm 5,29\%$, эффективно экстрагировался и, следовательно, был завышен при анализе HPLC.

Кроме того, кажется, что соединения rhPSMA 7.2 и 7.4 выводятся несколько быстрее (см. Значения для мочи). Эти соединения показывают в целом отрицательные изменения в твердых тканях и крови, хотя оба соединения демонстрируют более высокое сродство и скорость интернализации по сравнению с rhPSMA7.1. Может ли это быть вызвано метаболической деградацией 7,2 и 7,4 (оба являются производными L-Dar), 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 повышенной активности накопления, а активность выведения из крови было высокоэффективным (см. табл. 3), мы предполагаем, что не произошло значительного разложения rhPSMA7.2 и 7.4. Это предположение подтверждается подозрительными значениями SUV для ткани печени (желчный пузырь, кишечник) в контексте клинического применения $[^{18}\text{F}]\text{rhpsma-gac}$ у людей.

TLC-анализ у мышей с опухолями через 30 мин после введения. Радио-TLC анализ проводился: а) на образцах мочи путем прямого нанесения небольшого объема на полосу TLC, б) путем анализа небольшого объема неиммобилизованной активности в процессе SPE ('прорывная фракция') и в) путем анализа небольшого объема элюатов картриджа.

Таблица 13. TLC анализ крови, органов и мочи

Дата	Образец	TLC Сканнер		Фосфоримиджер		Комментарий *
		Нетронутый индикатор [%]	¹⁸ F-фторид [%]	Нетронутый индикатор [%]	¹⁸ F-фторид [%]	
30.07.2018	QK					Интенсивность сигнала TLC [cts] (в целом очень низкая)
	Кровь	85,96	14,04	Методологические проблемы		57
	Печень	80,99	19,01		142	
	Почка	94,04	5,96		369	
	Моча	82,51	17,49		726	
	Опухоль	94,19	5,81		172	
01.08.2018	QK	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
	Почка	94,58	5,42			572
	Моча	96,2	3,80	98,55	1,55	395
	Опухоль	90,53	9,47			190
02.08.2016	QK	Уровень активности слишком низкий для TLC		97,43	2,57	
	Кровь			96,80	3,20	
	Печень			74,15 [#]	25,85 [#]	
	Почка			96,48	3,52	
	Моча			95,85	4,15	
	Опухоль			96,47	4,15	
(*) из-за низкого уровня активности были исключены измерения TLC с интенсивностью сигнала менее 200 cts.						

Обсуждение данных TLC

Поскольку очень трудно обнаружить н.к.а. ¹⁸F-фторид с помощью RP-18 хроматографии (из-за свободных групп Si-OH матрицы, которые взаимодействуют с н.к.а. фторидом), для количественного определения F-18-фторида в экстрагированных растворах проводили тонкослойную хроматографию.

Поскольку ни один из реагентов и солей, обычно применяемых для осаждения белков, не тестируется на холодный фторид, и чтобы избежать возможного высвобождения F-18-фторида из индикатора путем изотопного обмена, осаждение белков в процессе пробоподготовки не проводилось, хотя такая белковая нагрузка часто приводит к ограниченному разделению пиков, появлению хвостов у пиков и активности, которая остается на линии старта. Растворы, полученные после экстракции тканей (или центрифугирования крови), непосредственно применялись для TLC-анализа.

Хотя активность, доступная для анализа, была довольно низкой во всех образцах, результаты TLC показывают, что общее включение F-18-флуорида было ниже примерно 6% в исследованных тканях, за исключением

образца мочи от 30 июля 2018 г. (свободный фторид 17,49%),
образца печени от 02 августа 2018 г. (свободный фторид 25,85%).

В то время как анализ мочи с помощью TLC считается достоверным результатом (см. профиль на фиг. 20), результат, полученный с образцом печени, обусловлен появлением значительного хвоста у пика, представляющего интактный индикатор (см. фиг. 18). Кроме того, можно сделать вывод, что вышеупомянутые макс. 6% свободного фторида представляют собой завышенное значение, так как хвостовая часть пика, даже полученная во время QK и высвобождения [F-18]rhPSMA7-гас в PBS (фиг. 18) для клинического применения, показывают хвост пика продукта. Как показывают фосфоизображения, этот хвост наблюдается почти в каждом анализе TLC и вносит свой вклад в интегральную площадь F-18-фторида.

Следует отметить, что ни исследования биораспределения, ни клинические ПЭТ-сканирования у людей (по состоянию на июль 2018 г.: около 1400 сканирований с [F-18]rhPSMA7-гас) не привели к како-

му-либо подозрительному или идентифицируемому накоплению F-18 в костях высвобожденным фторидом F-18. Для дальнейшего изучения высвобождения фторида F-18 из [F-18]rhPSMA7-гас (наблюдаемого в одном образце мочи) авторы заявки исследовали наличие F-18-фторида в других образцах мочи (нормальные мыши) с помощью HPLC RP-18 (новая колонка с закрытыми концами RP-18) и TLC.

Радио-TLC-анализ образования F-18-фторида у нормальных мышей через 30 мин после введения

Для этого использовали нормальных мышей. Образцы мочи собирали с помощью катетера в течение 30 минут. Мочу центрифугировали и непосредственно подвергали HPLC и TLC.

Как показано на фиг. 21, левая колонка, свободный F-18-фторид обнаружили в образцах мочи всех изомеров и также он образовался, когда свежая моча "инкубировалась с [F-18]rhPSMA7.4. (правая колонка). Идентификацию F-18-фторида проводили путем демонстрации того, что: а) эта частица удерживается на картриджах QMA (данные не показаны), б) элюируется в мертвом объеме колонок RP-18 и с) не может быть удержан или мобилизован на колонках RP-18 или пластинах RP-18 TLC, соответственно, независимо от применяемых подвижных фаз.

В связи с тем, что такие высокие количества фторида F-18 не обнаруживались в анализах HPLC крови или органов, таких как почки, опухоль, печень и др, в исследованиях биораспределения у мышей не наблюдалось повышенной активности накопления в костях, а также не наблюдалось повышенной активности накопления в костях во время клинических ПЭТ-сканирований с [F-18]rhPSMA7-гас, поскольку [F-18]rhPSMA7-гас создавали для клинического сканирования в конце 2017 г. в TUM (состояние на конец июля 2018 года: прил. 1400 ПЭТ-сканирований у пациентов с раком предстательной железы), мы пришли к выводу, что [F-18]фторид может образовываться в дальнейшем в результате клубочковой фильтрации индикатора, что приводит к образованию и последующему выведению [F-18]фторида БЕЗ обнаруживаемого накопления F-18-фторида в крови, органах или костях.

Это предположение подтверждается литературными данными по токсикологии фторида, в которых описывается соответствующее количество фторида в почках и моче. Нормальный уровень фторида в моче 0,3 ppm наблюдался у мышей (Bouaziz H et al., Fluoride 2005;38(1):23-31). В другой публикации среднюю концентрацию фторида в моче нормальных мышей определили на уровне 0,13-0,14 мкг/мл (Poesina ND et al. Rom J Morphol Embryol 2014, 55(2):343-349), а Inkielewicz I. et al. обнаружили, что включение фторида в сыворотке крови крыс составляет около 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 всасывается и физиологически очищается почками, повышенный уровень фторида в почках в сочетании с температурой тела 36,6°C может привести к непрерывному выведению F-18-фторида из rhPSMA-соединений в почках.

Соответственно, свежие и нерадиоактивные образцы мочи, собранные у нормальных мышей, инкубировались с [F-18]rhPSMA7.x в течение различных периодов времени (см. легенду к фиг. 21). Фиг. 22, правая колонка, ясно показывает, что инкубация мочи с [F-18]rhPSMA7.x EX VIVO приводит к образованию свободного [F-18]фторида на различных уровнях, чему способствуют различные концентрации холодного F-19-фторида в образцах мочи и его увеличение с течением времени.

Для дальнейшего подтверждения гипотезы к свежей и нерадиоактивной моче мышей добавляли 500 нмоль холодного F-19-фторида, затем добавляли [F-18]rhPSMA7.3 и инкубировали в течение 2 часов. Согласно гипотезе, высокая концентрация [F-19]фторида должна привести к образованию значительного количества [F-18]фторида. На фиг. 23 показано, что в этих условиях происходит обмен 98,5 % радиоактивности и образование [F-18]фторид в течение 2 ч (фиг. 23).

Поскольку скорость изотопного обмена зависит от концентрации четырех соответствующих частиц в равновесии ([F-18]фторид, [F-19]фторид, [F-18]rhPSMA7.3 и [F-19]rhPSMA7.3), также исследовали, приведет 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 индикатора [F-19]rhPSMA7.3 к маркировке радиофармацевтического препарата [F-18]rhPSMA7-3. Неожиданно, даже небольшое количество 5 нмоль [F-19]rhPSMA7-3 в вышеуказанной моче 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 путем изотопного обмена в моче, считаются репрезентативными для всех индикаторов, конъюгированных с 4-(ди-трет-бутил [(18)F]фторсил)бензил)оксигруппой и, следовательно, для всех изомеров rhPSAM7.

Доклиническая дозиметрия, биораспределение у человека и поглощение в опухолевых поражениях

Обратите внимание, что в дальнейшем 18F-rhPSMA-7 обозначает ^{nat}Ga-¹⁸F-rhPSMA7-гас, а 18F-rhPSMA-7.3 обозначает ^{nat}Ga-¹⁸F-rhPSMA7.3.

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

Цель заключалась в оценке распределения и выведения ¹⁸F-rhPSMA-7 и ¹⁸F-rhPSMA-7.3 в различных временных точках до 300 мин после однократного внутривенного введения мышам и проведении расчетов для внутренней дозиметрии.

Способы

3-5 мышам вводили инъекции в каждый момент времени в среднем $25,6 \pm 3,6$ МБк $^{18}\text{F-rhPSMA-7}$ и $28,5 \pm 4,8$ МБк $^{18}\text{F-rhPSMA-7.3}$, соответственно. Для экспериментов использовали мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID). Все эксперименты на животных проводились в соответствии с общими правилами содержания животных в Германии и институциональным руководством по уходу и применению животных.

Мышей умерщвляли в следующие моменты времени:

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

$^{18}\text{F-rhPSMA-7.3}$: 10, 60, 120, 180 и 300 мин после введения.

Обратите внимание, что на основании начальных экспериментов, демонстрирующих пролонгированное поглощение почками $^{18}\text{F-rhPSMA-7.3}$, для заключительных экспериментов применялась поздняя временная точка (300 мин).

Дальнейший сбор тканей/жидкостей:

Моча, кровь, сердце, легкие, селезенка, поджелудочная железа, печень, желудок (опорожненный), тонкий кишечник (опорожненный), толстый кишечник (опорожненный), почки, мочевого пузыря, яичко, жир, мышцы (частичные, бедренные), бедренная кость, хвост и головной мозг. Мочу собирали пипеткой в камере с CO_2 . При отсутствии мочеиспускания в камере мочевого пузыря отсасывали инсулиновым шприцем. Кровь брали сразу после умерщвления инсулиновым шприцем из сердца. Все остальные ткани и органы были рассечены и перенесены непосредственно в пластиковые контейнеры.

Вес образцов в пластиковых контейнерах измерялся с помощью электронных весов. Вес пустых и предварительно промаркированных пластиковых контейнеров для выделенных образцов измеряли заранее. Собственный вес пластиковых контейнеров вычитали из веса образца для измерений с пластиковым контейнером. Рассчитанный таким образом вес обозначали как вес образца для измерения.

Пластиковые контейнеры, включающие образцы для измерения, помещали в специальные стойки автоматического гамма-счетчика (PerkinElmer - Wallac, Waltham, USA) для измерения скорости счета в течение 60 с (количество импульсов в минуту = имп/мин). Кроме того, вместе с образцами измеряли 1% (об/об) стандарт ($n=5$) с известным количеством радиоактивности для преобразования скорости счета образцов органов в активность.

Анализ данных

Скорость счета измерительных образцов автоматически корректировалась с учетом распада. Коэффициенты распределения радиоактивности (единица измерения: процент от введенной дозы (%ID)) в измеряемых образцах определялись по приведенному ниже уравнению. Сумма скоростей счета всех измеряемых образцов, полученных от одной мыши, определяли как скорость счета для введенной радиоактивности.

$$\text{Процент от введенной дозы (\%ID)} = \frac{\text{скорость счета для измеряемого образца}}{\text{сумма скоростей счета для всех измеряемых образцов от одной мыши}} * 100$$

Коэффициент распределения радиоактивности на единицу веса образца для измерения (единица измерения: %ID/г), исключая образцы мочи и кала, определялся с помощью приведенного ниже уравнения. Вес образца для измерения определяли путем вычитания веса пустого контейнера для измерения из веса контейнера, включающего образец.

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

Дозиметрический анализ

Для согласованности статистических расчетов для каждого радиотерапевтического средства применялось одинаковое количество временных точек для $^{18}\text{F-rhPSMA-7}$ и $^{18}\text{F-rhPSMA-7.3}$. Таким образом, для $^{18}\text{F-rhPSMA-7}$ временные точки 10 и 20 мин объединяли, в результате чего конечная точка составила 15 мин.

Интеграл по времени активности для накопления в важных исходных органах (AUC) был получен как с численным интегрированием, так и с физическим распадом согласно J Juan et al, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1993, 82: 762-763.

Kirshner et al. разработали способ, который применяет линейное масштабирование процента введенной животному дозы по соотношению веса органов и общего веса тела фантомов обеих частиц.

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

Kirschner A, Ice R, Beierwaltes W. Letters to the editor. J Nucl Med. (1975):248-9. Вкратце, для расчета дозиметрии человека по биораспределению у мышей потребовалась экстраполяция, чтобы учесть различия между животными и людьми. Нормальные дозы облучения органов оценили для анатомической модели Standard Adult с массой тела 70 кг с применением зависящих от времени концентраций активности органов (в процентах от введенной дозы на грамм, % ID/г) и активности всего тела, измеренной в исследованиях биораспределения на мышках.

Концентрации активности в тканях мышей преобразовали в фракционные активности тканей 70-килограммового стандартного взрослого, применяя относительные фракционные массы органов стандартного взрослого и "стандартной" 25-граммовой мыши. Зависимую от времени общую активность тела подгоняли под экспоненциальную функцию и предполагали, что разница между введенной активностью и общей активностью тела выводится с мочой, поскольку концентрации активности в печени и ЖКТ были низкими во всех исследуемых временных точках.

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 во всем теле и суммой времен 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 рассчитывали эквиваленты стандартной средней дозы на орган для взрослых (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 радиоактивных частиц (то есть исходный орган), были почки, селезенка, легкие, печень и сердце. Что касается активности накопления и выведения, обнаружили 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 ч

Орган-мишень	Альфа	Бета	Фотон	Общее	EDE Cont.	ED Cont.
Надпочечники	0,00E000	1,95E-03	5,85E-03	7,80E-03	0,00E000	3,90E-05
Мозг	0,00E000	1,95E-03	2,54E-03	4,49E-03	0,00E000	2,24E-05
Молочные железы	0,00E000	1,95E-03	2,29E-03	4,24E-03	6,36E-04	2,12E-04
Стенка желчного пузыря	0,00E000	1,95E-03	5,54E-03	7,49E-03	0,00E000	0,00E000
Стенка LLI (нижний отдел)	0,00E000	1,95E-03	1,41E-02	1,61E-02	9,66E-04	1,93E-03

толстого кишечника)						
Тонкий кишечник	0,00E000	1,95E-03	8,40E-03	1,04E-02	0,00E000	5,18E-05
Стенка желудка	0,00E000	1,95E-03	5,05E-03	7,00E-03	0,00E000	8,40E-04
Стенка ULI (верхний отдел толстого кишечника)	0,00E000	1,95E-03	7,31E-03	9,26E-03	0,00E000	4,63E-05
Стенка сердца	0,00E000	8,82E-04	3,54E-03	4,42E-03	0,00E000	0,00E000
Почки	0,00E000	4,70E-02	1,80E-02	6,51E-02	3,91E-03	3,25E-04
Печень	0,00E000	6,35E-04	3,63E-03	4,27E-03	0,00E000	2,13E-04
Легкие	0,00E000	1,25E-03	3,04E-03	4,30E-03	5,16E-04	5,16E-04
Мышцы	0,00E000	1,95E-03	5,73E-03	7,68E-03	0,00E000	3,84E-05
Яичники	0,00E000	1,95E-03	1,35E-02	1,55E-02	3,87E-03	3,09E-03
Поджелудочная железа	0,00E000	1,95E-03	6,13E-03	8,08E-03	0,00E000	4,04E-05
Красный костный мозг	0,00E000	1,95E-03	5,41E-03	6,80E-03	8,16E-04	8,16E-04
Остеогенные клетки	0,00E000	4,18E-03	4,75E-03	8,93E-03	2,68E-04	8,93E-05
Кожа	0,00E000	1,95E-03	2,98E-03	4,93E-03	0,00E000	4,93E-05
Селезенка	0,00E000	1,59E-02	1,01E-02	2,61E-02	1,56E-03	1,30E-04
Семенники	0,00E000	1,95E-03	9,69E-03	1,16E-02	0,00E000	0,00E000
Тимус	0,00E000	1,95E-03	3,24E-03	5,18E-03	0,00E000	2,59E-05
Щитовидная железа	0,00E000	1,95E-03	3,23E-03	5,18E-03	1,55E-04	2,59E-04
Стенка мочевого пузыря	0,00E000	2,45E-01	1,08E-01	3,54E-01	2,12E-02	1,77E-02
Матка	0,00E000	1,95E-03	2,61E-02	2,80E-02	1,68E-03	1,40E-04
Все тело	0,00E000	2,37E-03	5,39E-03	7,77E-03	0,00E000	0,00E000
Эквивалент эффективной дозы (мЗв/МБк)	3,56E-02					
Эффективная доза (мЗв/МБк)	2,66E-02					

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

Орган-мишень	Альфа	Бета	Фотон	Общее	EDE Cont.	ED Cont.
Надпочечники	0,00E000	1,95E-03	5,64E-03	7,59E-03	0,00E000	3,79E-05
Мозг	0,00E000	1,95E-03	2,54E-03	4,49E-03	0,00E000	2,24E-05
Молочные железы	0,00E000	1,95E-03	2,25E-03	4,20E-03	6,30E-04	2,10E-04
Стенка желчного пузыря	0,00E000	1,95E-03	4,96E-03	6,91E-03	0,00E000	0,00E000
Стенка LLI	0,00E000	1,95E-03	7,25E-03	9,20E-03	5,52E-04	1,10E-03
Тонкий кишечник	0,00E000	1,95E-03	5,79E-03	7,73E-03	0,00E000	3,87E-05
Стенка желудка	0,00E000	1,95E-03	4,70E-03	6,65E-03	0,00E000	7,98E-04
Стенка ULI	0,00E000	1,95E-03	5,33E-03	7,27E-03	0,00E000	3,64E-05
Стенка сердца	0,00E000	8,82E-04	3,48E-03	4,36E-03	0,00E000	0,00E000
Почки	0,00E000	4,70E-02	1,76E-02	6,47E-02	3,88E-03	3,23E-04
Печень	0,00E000	6,35E-04	3,39E-03	4,02E-03	0,00E000	2,01E-04
Легкие	0,00E000	1,25E-03	3,01E-03	4,26E-03	5,11E-04	5,11E-04
Мышцы	0,00E000	1,95E-03	4,01E-03	5,96E-03	0,00E000	2,98E-05
Яичники	0,00E000	1,95E-03	7,21E-03	9,16E-03	2,29E-03	1,83E-03
Поджелудочная железа	0,00E000	1,95E-03	5,86E-03	7,80E-03	0,00E000	3,90E-05
Красный костный мозг	0,00E000	1,39E-03	4,29E-03	5,68E-03	6,82E-04	6,82E-04
Остеогенные клетки	0,00E000	4,18E-03	4,09E-03	8,27E-03	2,48E-04	8,27E-05
Кожа	0,00E000	1,95E-03	2,38E-03	4,32E-03	0,00E000	4,32E-05
Селезенка	0,00E000	1,59E-02	9,90E-03	2,58E-02	1,55E-03	1,29E-04
Семенники	0,00E000	1,95E-03	5,09E-03	7,03E-03	0,00E000	0,00E000
Тимус	0,00E000	1,95E-03	3,20E-03	5,15E-03	0,00E000	2,57E-05
Щитовидная железа	0,00E000	1,95E-03	3,23E-03	5,17E-03	1,55E-04	2,59E-04
Стенка мочевого пузыря	0,00E000	7,87E-02	3,66E-02	1,15 E-01	6,92E-03	5,76E-03
Матка	0,00E000	1,95E-03	1,12E-02	1,31E-02	7,87E-04	6,56E-05
Все тело	0,00E000	2,27E-03	3,93E-03	6,19E-03	0,00E000	0,00E000
Эквивалент эффективной дозы (мЗв/МБк)			1,82E-02			
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 ч

Орган-мишень	Альфа	Бета	Фотон	Общее	EDE Cont.	ED Cont.
Надпочечники	0,00E000	3,12E-03	7,93E-03	1,10E-02	0,00E000	5,52E-05
Мозг	0,00E000	3,12E-03	4,07E-03	7,19E-03	0,00E000	3,59E-05
Молочные железы	0,00E000	3,12E-03	3,55E-03	6,67E-03	1,00E-03	3,34E-04
Стенка желчного пузыря	0,00E000	3,12E-03	7,46E-03	1,06E-02	0,00E000	0,00E000
Стенка LLI	0,00E000	3,12E-03	1,28E-02	1,59E-02	9,53E-04	1,91E-03
Тонкий кишечник	0,00E000	3,12E-03	9,42E-03	1,25E-02	0,00E000	6,27E-05
Стенка желудка	0,00E000	3,12E-03	7,02E-03	1,01E-02	0,00E000	1,22E-03
Стенка ULI	0,00E000	3,12E-03	8,57E-03	1,17E-02	0,00E000	5,85E-05
Стенка сердца	0,00E000	1,32E-03	5,39E-03	6,71E-03	0,00E000	0,00E000
Почки	0,00E000	5,11E-02	2,07E-02	7,18E-02	4,31E-03	3,59E-04
Печень	0,00E000	9,70E-04	5,02E-03	5,99E-03	0,00E000	3,00E-04
Легкие	0,00E000	1,95E-03	4,66E-03	6,61E-03	7,93E-04	7,93E-04
Мышцы	0,00E000	3,12E-03	6,55E-03	9,67E-03	0,00E000	4,83E-05
Яичники	0,00E000	3,12E-03	1,26E-02	1,57E-02	3,92E-03	3,14E-03
Поджелудочная железа	0,00E000	3,12E-03	8,29E-03	1,14E-02	0,00E000	5,70E-05
Красный костный мозг	0,00E000	2,22E-03	6,79E-03	9,01E-03	1,08E-03	1,08E-03
Остеогенные клетки	0,00E000	6,70E-03	6,52E-03	1,32E-02	3,97E-04	1,32E-04
Кожа	0,00E000	3,12E-03	3,83E-03	6,95E-03	0,00E000	6,95E-05
Селезенка	0,00E000	1,52E-02	1,15E-02	2,67E-02	1,60E-03	1,34E-04
Семенники	0,00E000	3,12E-03	8,96E-03	1,21E-02	0,00E000	0,00E000
Тимус	0,00E000	3,12E-03	5,08E-03	8,20E-03	0,00E000	4,10E-05
Щитовидная железа	0,00E000	3,12E-03	5,15E-03	8,27E-03	2,48E-04	4,14E-04
Стенка мочевого пузыря	0,00E000	1,56E-01	7,14E-02	2,27E-01	1,36E-02	1,14E-02
Матка	0,00E000	3,12E-03	2,04E-02	2,36E-02	1,41E-03	1,18E-04
Все тело	0,00E000	3,52E-03	6,33E-03	9,86E-03	0,00E000	0,00E000
Эквивалент эффективной дозы (мЗв/МБк)			2,94E-02			
Эффективная доза (мЗв/МБк)			2,17E-02			

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

Орган-мишень	Альфа	Бета	Фотон	Общее	EDE Cont.	ED Cont.
Надпочечники	0,00E000	3,12E-03	7,79E-03	1,09E-02	0,00E000	5,46E-05
Мозг	0,00E000	3,12E-03	4,06E-03	7,18E-03	0,00E000	3,59E-05
Молочные железы	0,00E000	3,12E-03	3,53E-03	6,65E-03	9,97E-04	3,32E-04
Стенка желчного пузыря	0,00E000	3,12E-03	7,11E-03	1,02E-02	0,00E000	0,00E000
Стенка LLI	0,00E000	3,12E-03	8,45E-03	1,16E-02	6,94E-04	1,39E-03
Тонкий кишечник	0,00E000	3,12E-03	7,78E-03	1,09E-02	0,00E000	5,45E-05
Стенка желудка	0,00E000	3,12E-03	6,80E-03	9,92E-03	0,00E000	1,19E-03
Стенка ULI	0,00E000	3,12E-03	7,33E-03	1,05E-02	0,00E000	5,23E-05
Стенка сердца	0,00E000	1,32E-03	5,36E-03	6,68E-03	0,00E000	0,00E000
Почки	0,00E000	5,11E-02	2,04E-02	7,16E-02	4,29E-03	3,58E-04
Печень	0,00E000	9,70E-04	4,87E-03	5,84E-03	0,00E000	2,92E-04
Легкие	0,00E000	1,95E-03	4,63E-03	6,58E-03	7,90E-04	7,90E-04
Мышцы	0,00E000	3,12E-03	5,47E-03	8,59E-03	0,00E000	4,30E-05
Яичники	0,00E000	3,12E-03	8,61E-03	1,17E-02	2,93E-03	2,35E-03
Поджелудочная железа	0,00E000	3,12E-03	8,12E-03	1,12E-02	0,00E000	5,62E-05
Красный костный мозг	0,00E000	2,22E-03	6,09E-03	8,31E-03	9,97E-04	9,97E-04
Остеогенные клетки	0,00E000	6,70E-03	6,11E-03	1,28E-02	3,84E-04	1,28E-04
Кожа	0,00E000	3,12E-03	3,45E-03	6,57E-03	0,00E000	6,57E-05
Селезенка	0,00E000	1,52E-02	1,14E-02	2,66E-02	1,59E-03	1,33E-04
Семенники	0,00E000	3,12E-03	6,08E-03	9,20E-03	0,00E000	0,00E000
Тимус	0,00E000	3,12E-03	5,06E-03	8,18E-03	0,00E000	4,09E-05
Щитовидная железа	0,00E000	3,12E-03	5,15E-03	8,27E-03	2,48E-04	4,13E-04
Стенка мочевого пузыря	0,00E000	5,18E-02	2,66E-02	7,84E-02	4,70E-03	3,92E-03
Матка	0,00E000	3,12E-03	1,11E-02	1,43E-02	8,55E-04	7,13E-05
Все тело	0,00E000	3,45E-03	5,42E-03	8,87E-03	0,00E000	0,00E000
Эквивалент эффективной дозы (мЗв/МБк)				1,85E-02		
Эффективная доза (мЗв/МБк)				1,28E-02		

Заключение

Коэффициенты распределения радиоактивности были самыми высокими в почках после введения ^{18}F -rhPSMA-7 и ^{18}F -rhPSMA-7.3 во всех исследуемых временных точках у мышей. Более того, он был высоким в селезенке и мочевом пузыре для обоих радиоиндикаторов по сравнению со всеми другими оцениваемыми тканями, где отношения активности были ниже 8% ID/г.

Поскольку большая часть ^{18}F -rhPSMA-7/ ^{18}F -rhPSMA-7.3 увеличивает активность в почках и выведение через мочевой пузырь демонстрирует высокую активность, основной путь выведения определяется через почки и мочевыводящую систему.

При интервале опорожнения мочевого пузыря 3,5 и 1 ч 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 1-часового интервала между опорожнениями.

Различия, которые стоит упомянуть между обоими радиоактивными индикаторами, 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 описывается биораспределение ^{18}F -rhPSMA-7 и ^{18}F -rhPSMA-7.3. Оценка доказательства концепции была проведена в рамках программы сочувственного применения на безнадежных больных. Агент был применен 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 2-4 мин в положении лежа на кровати. Эмиссионные данные корректировались в расчете на случайность, мертвое время, рассеяние и затухание и восстанавливались итеративно с помощью алгоритма максимизации ожиданий упорядоченных подмножеств (четыре итерации, восемь подмножеств) с последующим сглаживающим фильтром Гаусса после реконструкции (полная ширина 5 мм на половине максимум).

Способы

Биораспределение у человека оценивалось путем анализа клинических исследований ^{18}F -rhPSMA-7 и ^{18}F -rhPSMA-7.3-ПЭТ/КТ у 47 и 32 пациентов соответственно. Средняя введенная активность составляла 324 (диапазон 236-424) МБк по сравнению с 345 (диапазон 235-420) МБк, а время поглощения составляло 84 (диапазон 42-166) мин и 76 (диапазон 59-122) мин для ^{18}F -rhPSMA-7 по сравнению с ^{18}F -rhPSMA-7.3 соответственно.

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

Для расчета SUV круговые области интереса рисовали вокруг областей с фокусным повышенным поглощением в трансаксиальных срезах и автоматически адаптировали к трехмерному интересующему объему (VOI) при изоконтуре 50%. Рассчитывали 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 накопления ^{18}F -rhPSMA-7 и ^{18}F -rhPSMA-7.3 были очень схожи с более низким сохранением активности 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 было 16,9 и 16,0 (околоушная железа), 19,6 и 19,6 (поднижнечелюстная железа), 2,0 и 1,9 (пул крови), 0,7 и 0,7 (легкие), 7,0 и 7,3 (печень), 9,1 и 8,5 (селезенка), 32,4 и 35,5 (почка), 2,5 и 2,8 (поджелудочная железа), 10,9 и 11,0 (двенадцатиперстная кишка), 1,1 и 1,3 (здоровая кость) и 10,2 и 2,0 (мочевой пузырь) для ^{18}F -rhPSMA-7 и ^{18}F -rhPSMA-7.3 соответственно. В частности, значения накопления ^{18}F -rhPSMA-7.3 по сравнению с ^{18}F -rhPSMA-7 были значительно ниже для удержания в мочевом пузыре ($2,0 \pm 0,8$ против $6,3 \pm 21,2$, $p < 0,05$) и значительно выше для опухолевых поражений ($32,5 \pm 42,7$ против $20,0 \pm 20,2$, $p < 0,05$).

Таблица 18. $\text{SUV}_{\text{макс}}$ и $\text{SUV}_{\text{среднее}}$ нормальных органов и опухолевых поражений с применением ^{18}F -rhPSMA-7. Данные показаны как среднее, минимальное и максимальное

	$\text{SUV}_{\text{макс}}$			$\text{SUV}_{\text{среднее}}$		
	Среднее	Мин	Макс	Среднее	Мин	Макс
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
Почки	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 ¹⁸F-rhPSMA-7.3. Данные показаны как среднее, минимальное и максимальное.

	SUV _{макс}			SUV _{среднее}		
	Среднее	Мин	Макс	Среднее	Мин	Макс
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
Почки	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.

	Отношение SUV _{макс}			Отношение SUV _{среднее}		
	Среднее	Мин	Макс	Среднее	Мин	Макс
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
Почки	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.

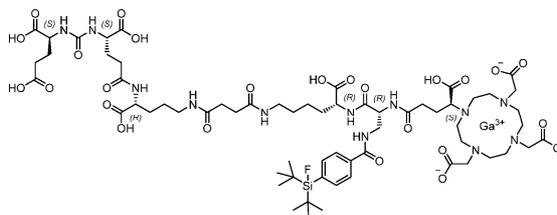
	Отношение SUV _{макс}			Отношение SUV _{среднее}		
	Среднее	Мин	Макс	Среднее	Мин	Макс
Околоушная железа	24,7	11,9	46,2	25,2	12,4	44,6
Поднижнечелюстная железа	28,2	14,0	62,1	30,6	15,7	62,3
Пул крови	2,8	1,5	5,2	2,9	1,7	4,9
Легкие	1,0	0,6	1,8	1,0	0,6	1,8
Печень	9,7	4,0	19,0	11,4	4,1	20,7
Селезенка	11,4	3,6	22,4	13,3	3,9	28,6
Почки	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 удержание индикатора 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 у человека и высоким поглощением опухолевыми поражениями ¹⁸F-rhPSMA-7.3 показаны на фиг. 28.

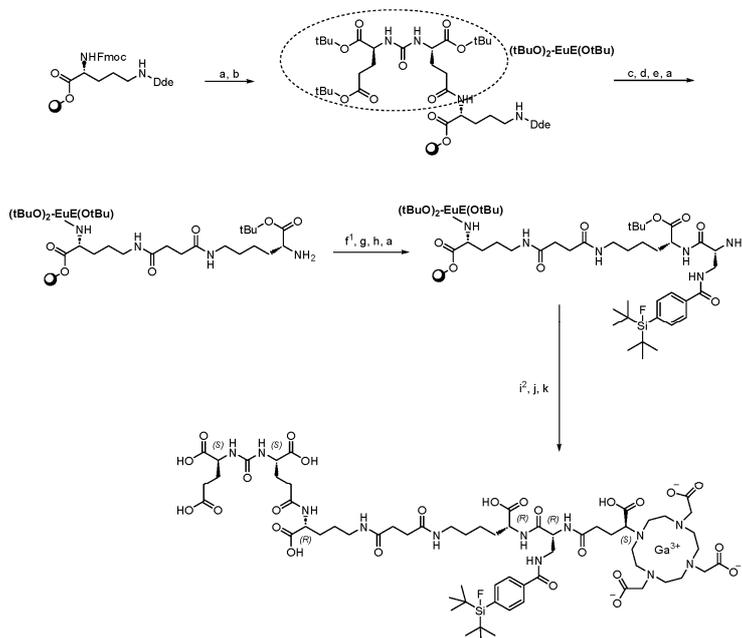
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение



или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п.1, в котором F представляет собой ^{18}F .
3. Соединение по п.1, в котором F представляет собой ^{19}F .
4. Соединение по любому из пп.1-3, в котором Ga^{3+} представляет собой $^{\text{nat}}\text{Ga}^{3+}$.
5. Соединение по п.1, в котором F представляет собой ^{18}F и Ga^{3+} представляет собой $^{\text{nat}}\text{Ga}^{3+}$.
6. Способ получения соединения по п.1, который включает стадии



где процедуры, обозначенные a, b, c, d, e, f¹, g, h, i², j и k представляют собой следующее:

- a) 20% пиперидин, (DMF);
- b) (tBuO)EuE(OtBu)₂, HOAt, TBTU, DIPEA, (DMF);
- c) 2% гидразин (DMF);
- d) янтарный ангидрид, DIPEA, (DMF);
- e) Fmoc-D-Lys(OtBu)-HCl, HOAt, TBTU, DIPEA, (DMF);
- f¹) Fmoc-D-Dap(Dde)-OH, HOAt, TBTU, 2,4,6-коллидин, (DMF);
- g) имидазол, гидроксилламин гидрохлорид, (NMP, DMF);
- h) SiFA-BA, HOAt, TBTU, DIPEA (DMF);
- i²) (S)-DOTA-GA(tBu)₄, HOAt, TBTU, 2,4,6-коллидин (DMF);
- j) очистка и депротекция: TFA, TIPS, H₂O;
- k) Ga(NO₃)₃, (tBuOH, H₂O).

7. Способ по п.6, дополнительно включающий последующую стадию ^{18}F -мечения.

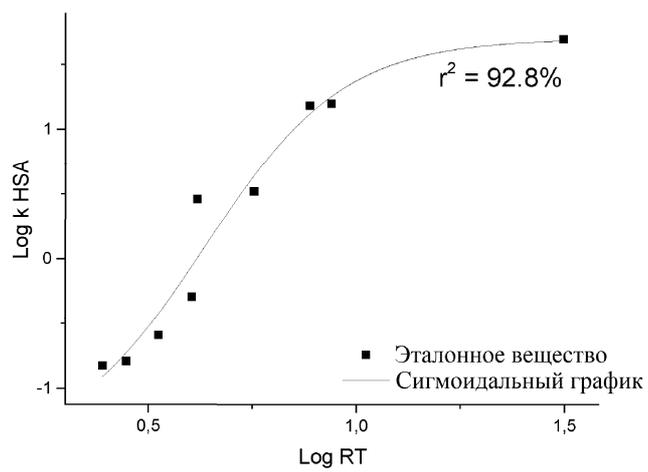
8. Применение соединения по любому из пп.1-5 в качестве средства для диагностики или визуализации рака, где рак связан со сверхэкспрессией PSMA.

9. Способ визуализации и/или диагностики рака, включающий введение соединения по любому из пп. 1-5 нуждающемуся в этом пациенту.

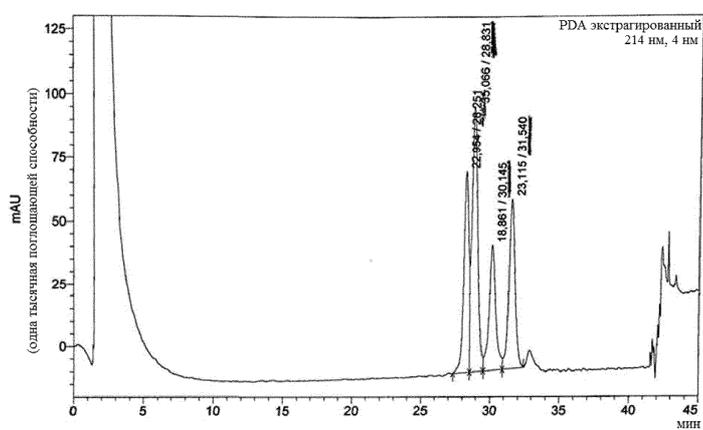
10. Применение соединения по любому из пп.1-5 в лечении рака, где рак связан со сверхэкспрессией PSMA.

11. Применение соединения по любому из пп.1-5 для диагностики, визуализации или предотвращения неоплазии / ангиогенеза.

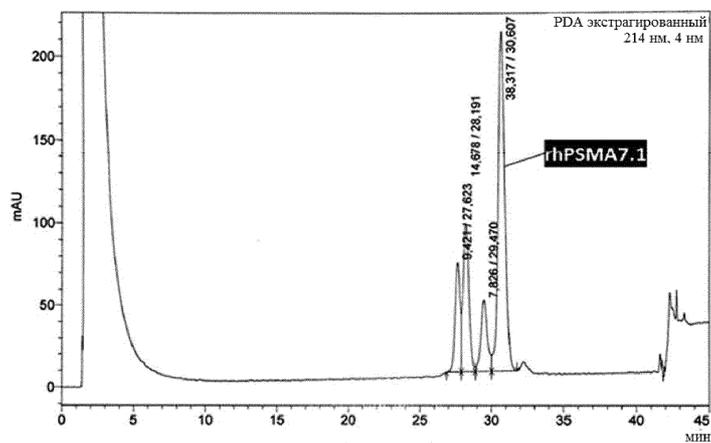
12. Применение по п.8 или 10, где рак представляет собой рак предстательной железы, рак молочной железы, рак легких, колоректальный рак или почечно-клеточную карциному.



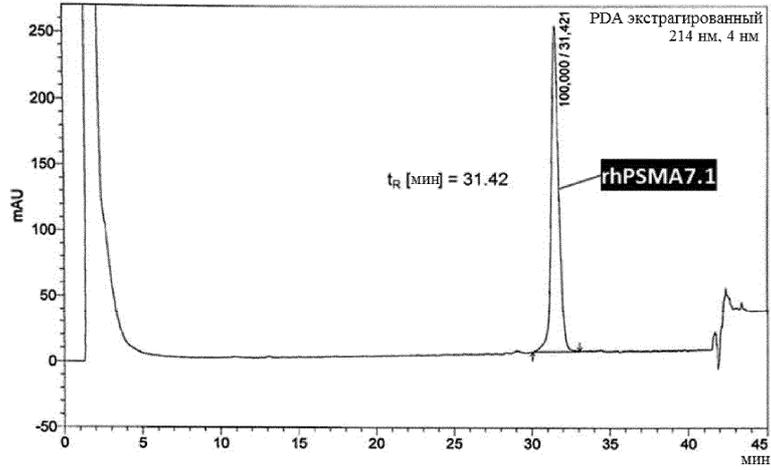
Фиг. 1



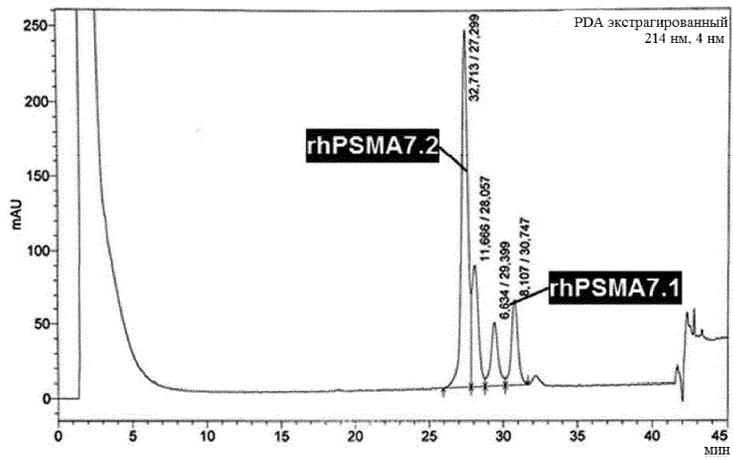
Фиг. 2a



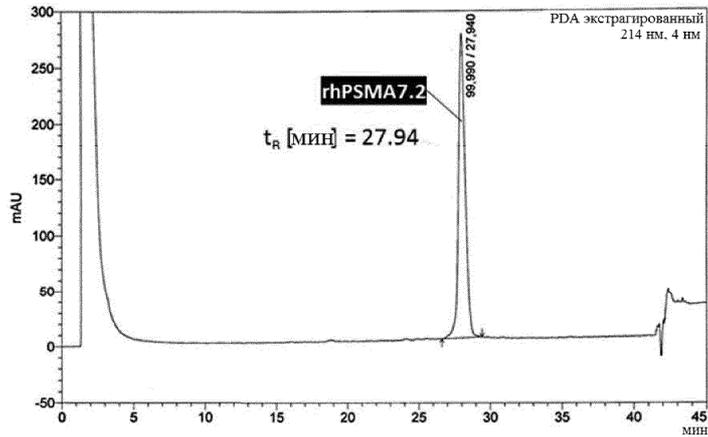
Фиг. 2b



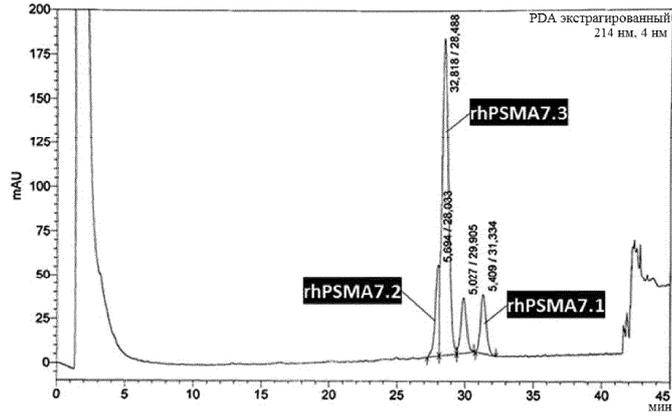
Фиг. 2с



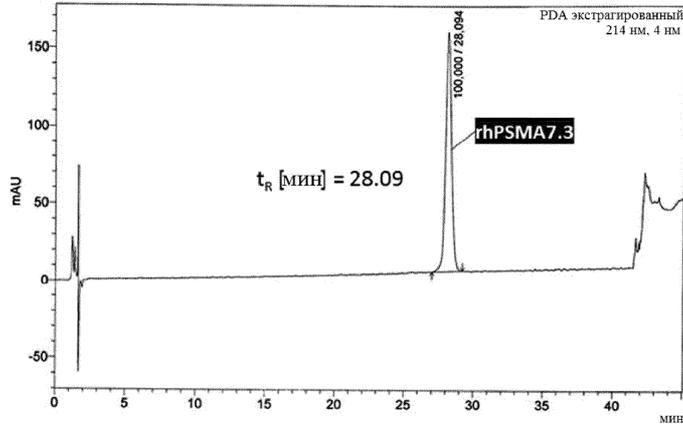
Фиг. 3а



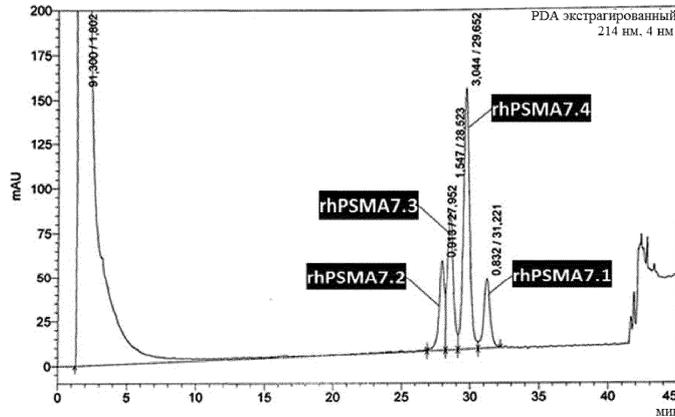
Фиг. 3б



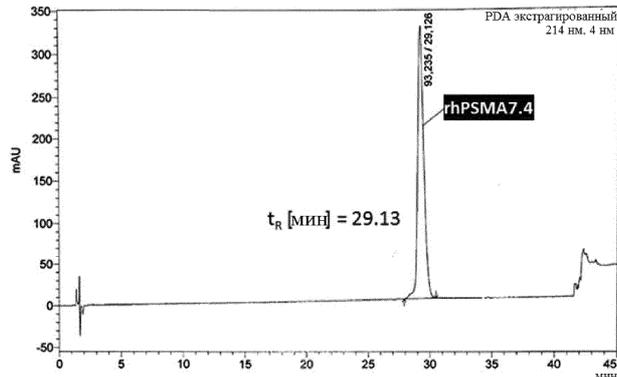
Фиг. 4а



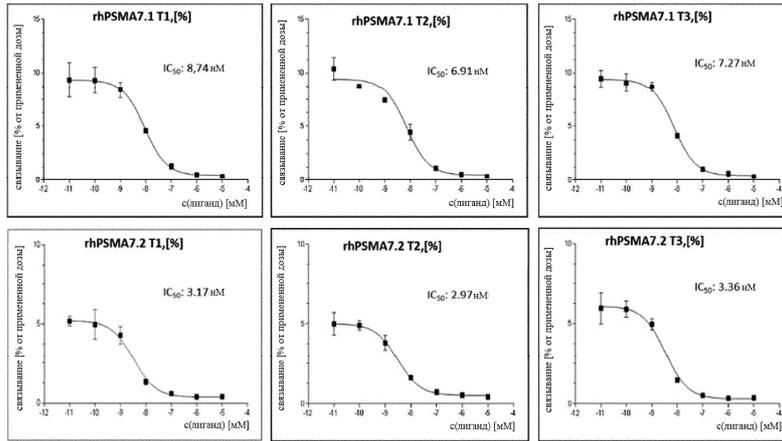
Фиг. 4б



Фиг. 5а

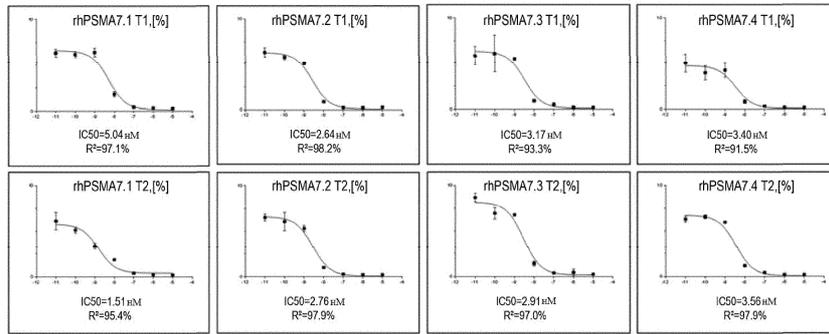


Фиг. 5б

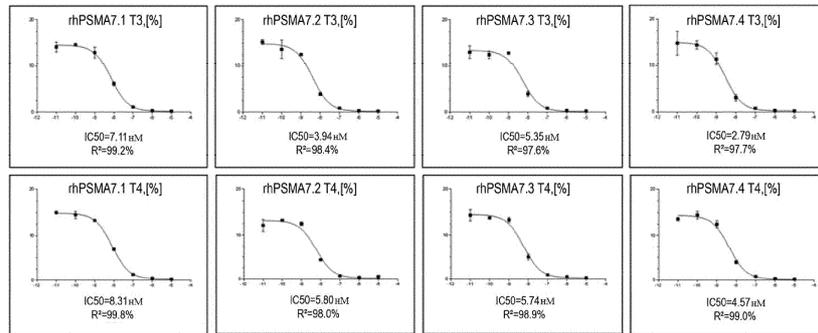


Фиг. 6а

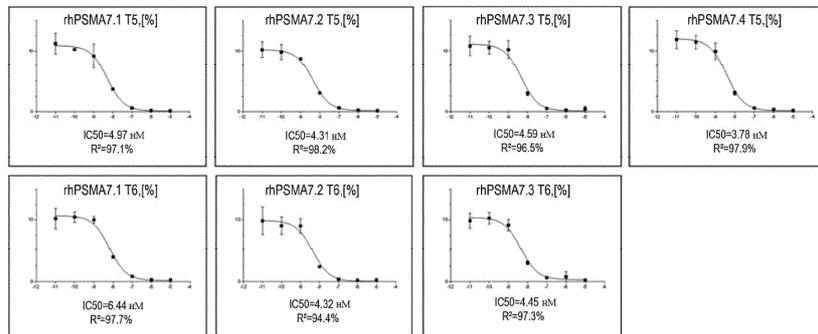
ось X - концентрация конкурентов [10³М]
 ось Y - связывание (% от примененной дозы)



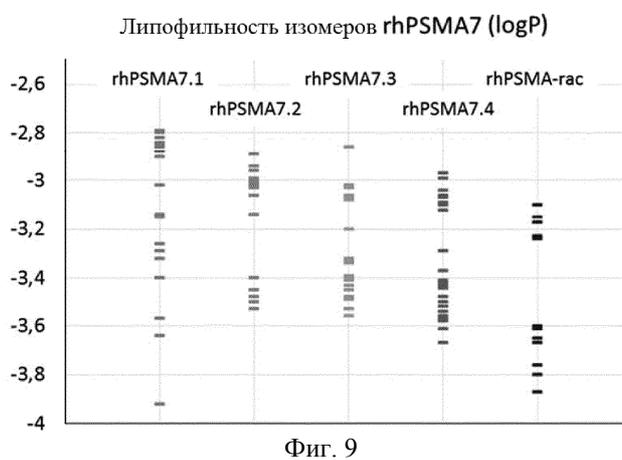
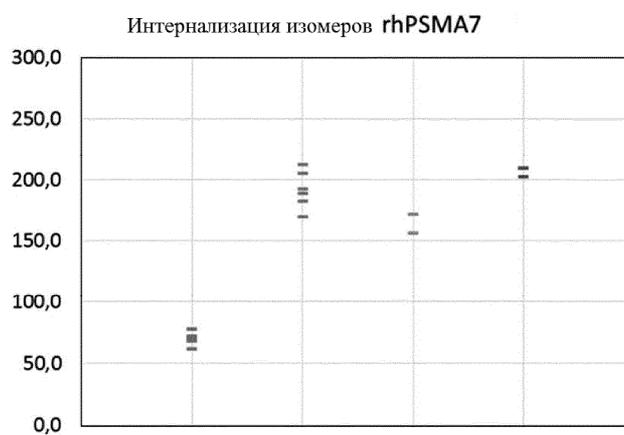
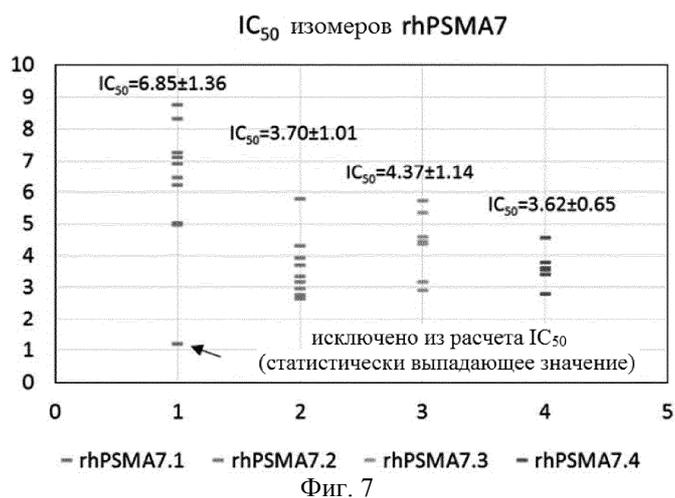
ось X - концентрация конкурентов [10³М]
 ось Y - связывание (% от примененной дозы)

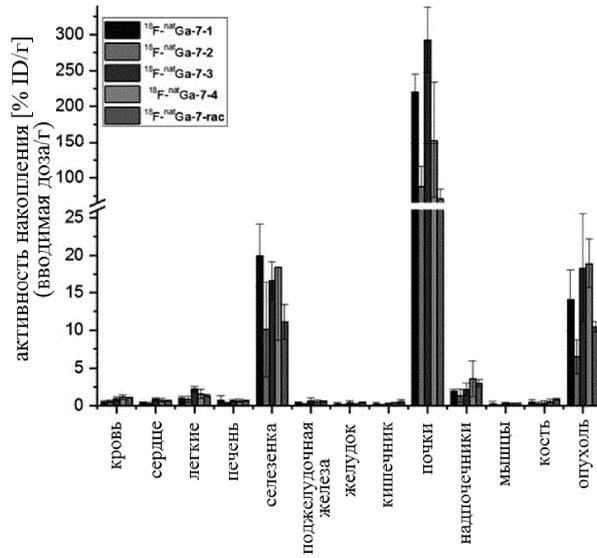


ось X - концентрация конкурентов [10³М]
 ось Y - связывание (% от примененной дозы)

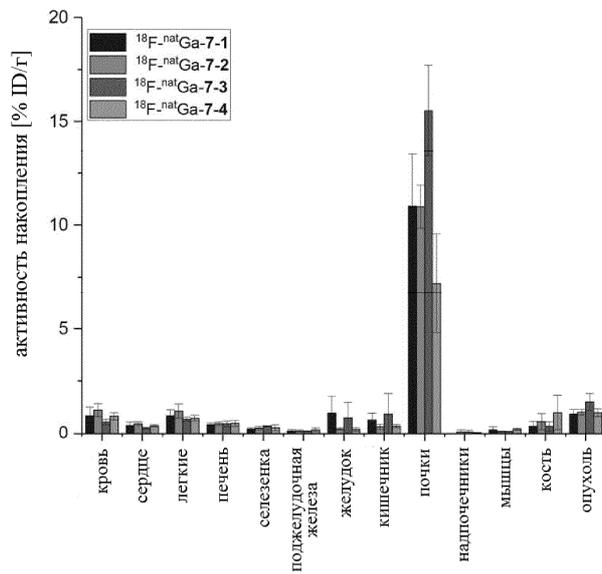


Фиг. 6б

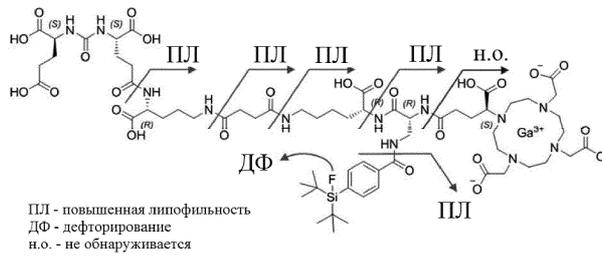




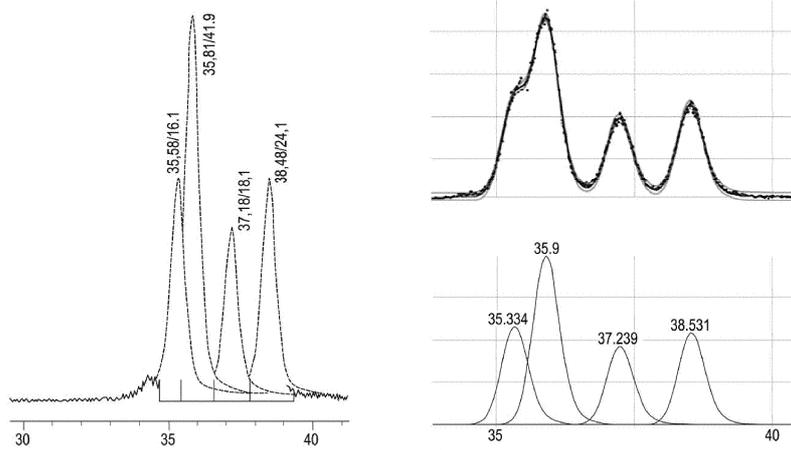
Фиг. 10



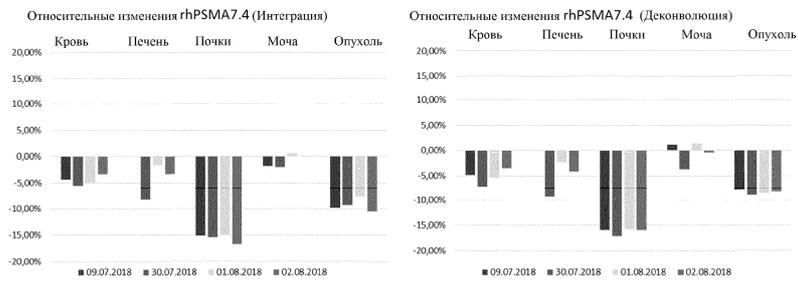
Фиг. 11



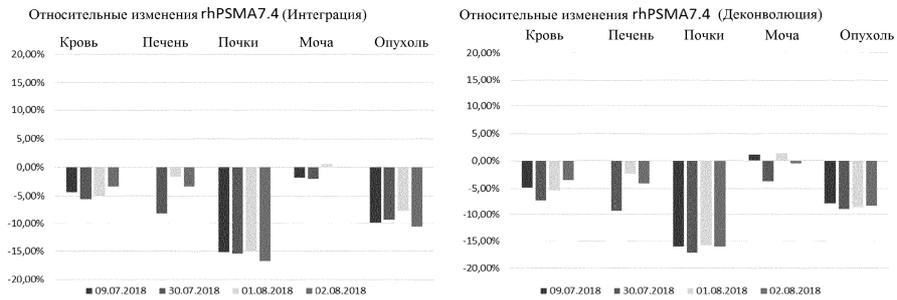
Фиг. 12



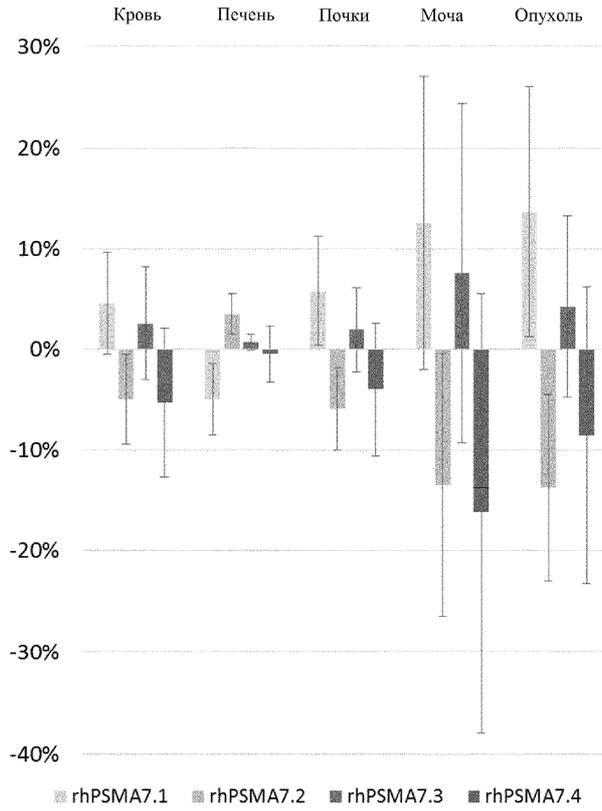
Фиг. 13



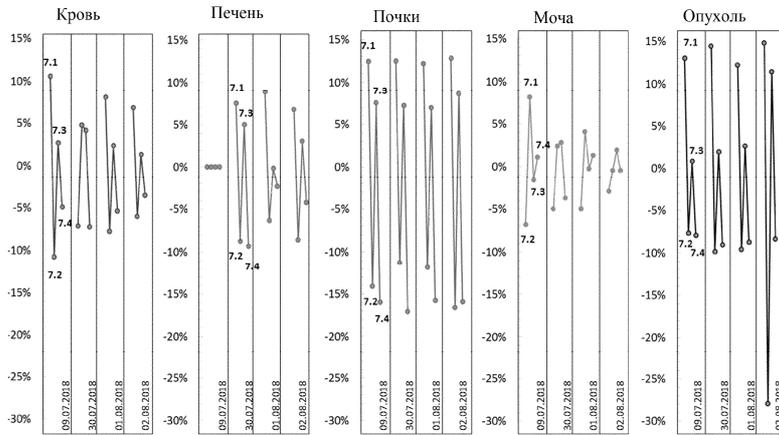
Фиг. 14а



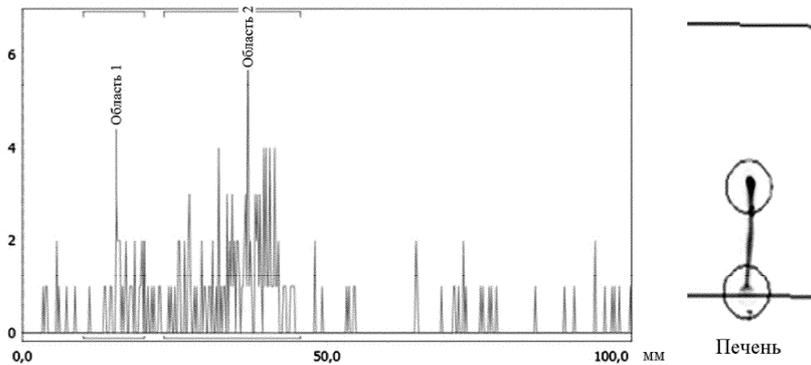
Фиг. 14б



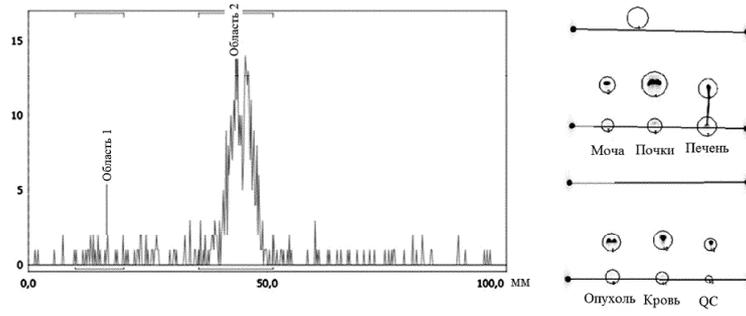
Фиг. 15



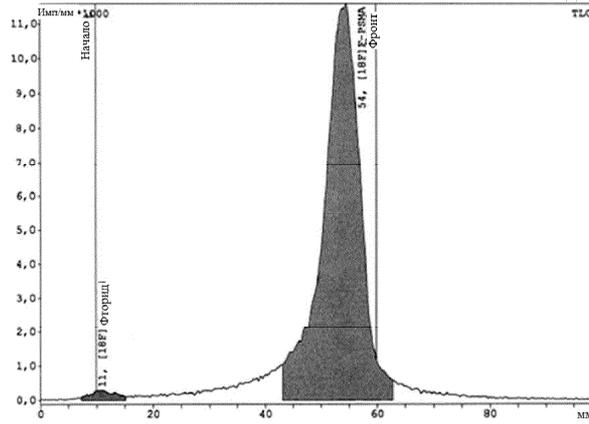
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18

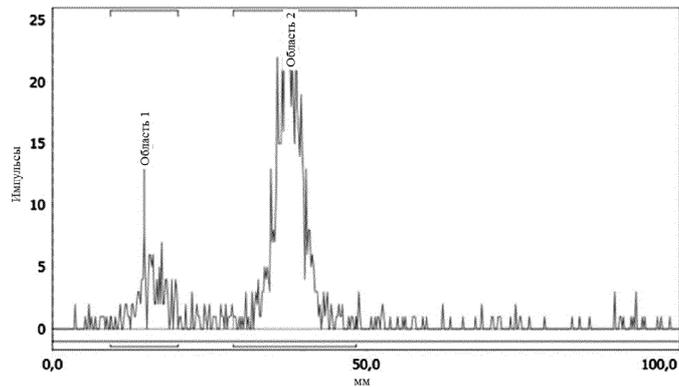


Интеграция TLC

Вещество	RF	Всего, %	Тип	Площадь (ед. инт.)	Площадь, %	Инструмент	Удерж. мм	Соотн. S/N
[18F] Фторид	0,013	1,50	DD	1614,00	1,74	TLC	10,52	6,3
[18F]F-PSMA	0,888	84,68	DD	91023,00	98,26	TLC	54,27	167,5
Всего в ROI				92637,00	100,00			
Общая площадь				107492,00				
RF площади (общей)				99480,00				

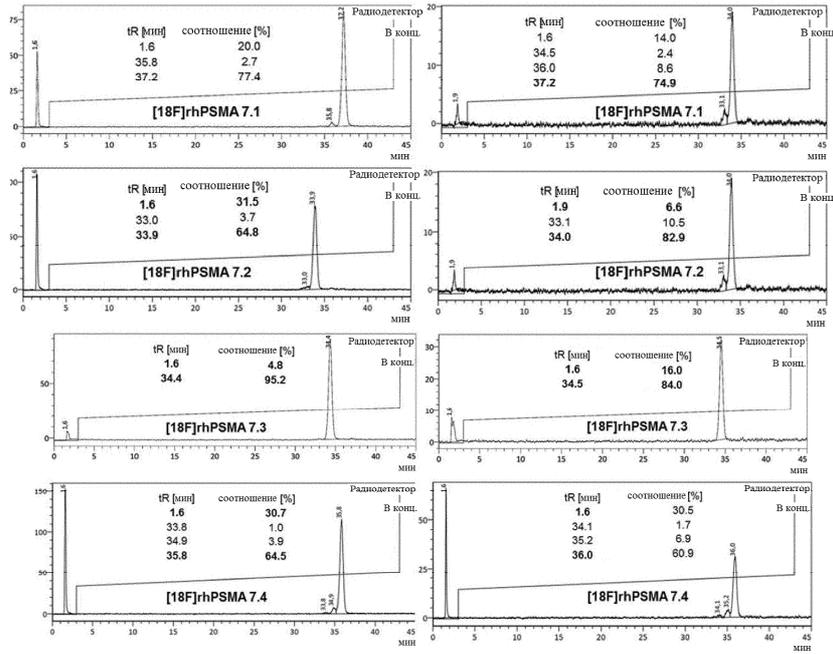
RF - коэффициент удерживания
S/N - отношение сигнала шуму
ROI - область интереса
Ед. инт. - единицы интенсивности

Фиг. 19

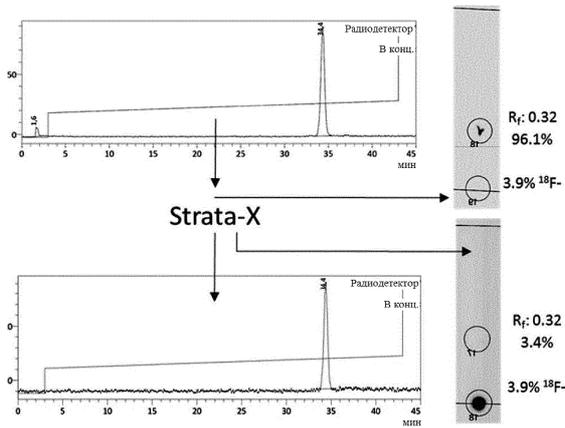


Области	¹⁸ F		Детектор ФЭУ (фотоэлектронный умножитель)			
	Начало (мм)	Конеч (мм)	Удерживание (RF)	Площадь (ед. инт.)	%ROI (%)	%Всего (%)
Область 1	9,2	20,0	0,073	127	17,49	14,02
Область 2	28,8	48,4	0,189	599	82,51	66,11
2 пика				726	100,00	80,13

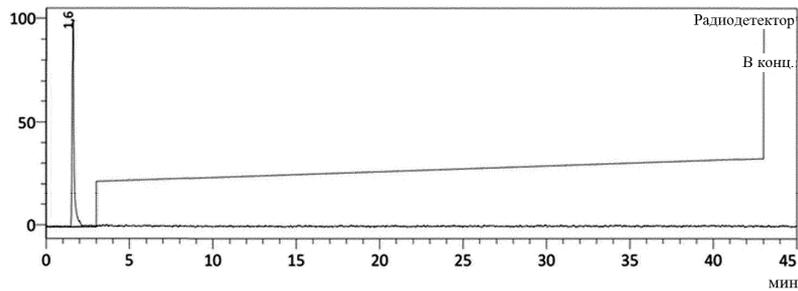
Фиг. 20



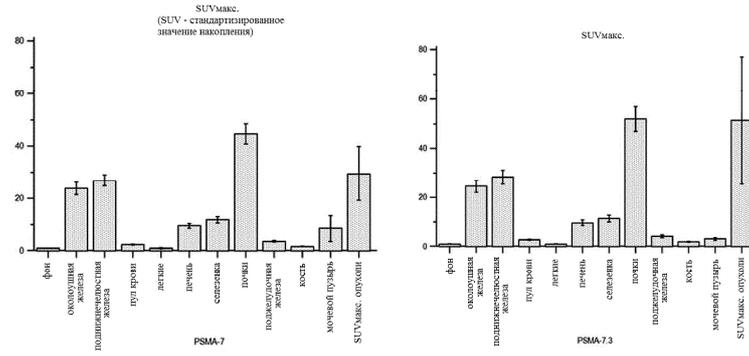
Фиг. 21



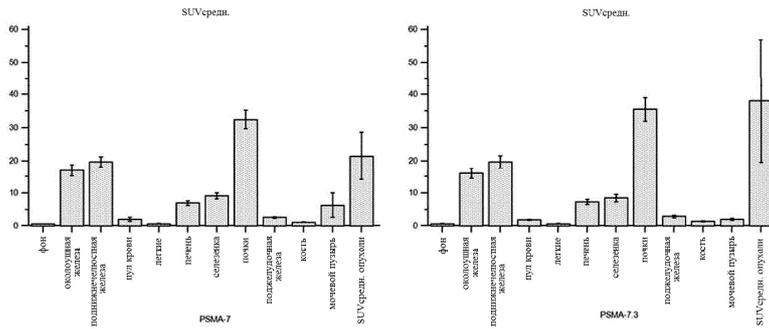
Фиг. 22



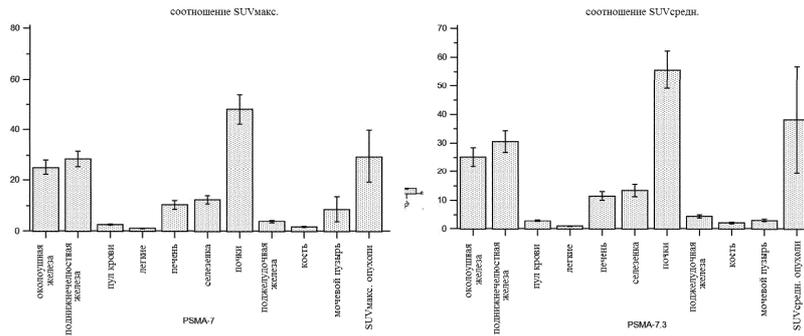
Фиг. 23



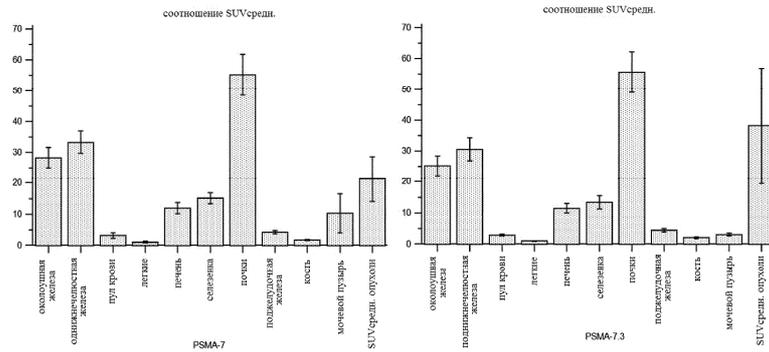
Фиг. 24



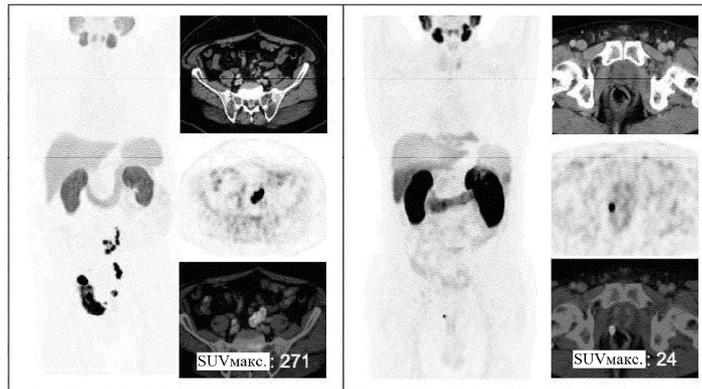
Фиг. 25



Фиг. 26



Фиг. 27



Фиг. 28