



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **103314** (13) **C2**
(51) МПК (2013.01)
C07K 7/08 (2006.01)
A61K 51/08 (2006.01)
A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

- (21) Номер заявки: **а 2010 11560**
(22) Дата подання заявки: **27.02.2009**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.10.2013**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **08075180.3**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **07.03.2008**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **EP**
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.11.2010, Бюл.№ 21**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.10.2013, Бюл.№ 19**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ **PCT/EP2009/001403, 27.02.2009**
(72) Винахідник(и):
**Мекке Гельмут (DE),
Рьобі Жан Клод (CH),
Мансі Розальба (IT/CH)**
(73) Власник(и):
**УНІВЕРСИТЕТСШПІТАЛЬ БАЗЕЛЬ,
Hebelstrasse 32, CH-4031 Basel, Switzerland (CH),
УНІВЕРСИТЕТ БЕРН,
Hochschulstrasse 4, CH-3012 Bern, Switzerland (CH)**
(74) Представник:
**Петров Андрій Володимирович, реєстр.
№139**

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
EP 1 181 936 A, 27.02.2002
US 2008/008649 A1, 10.01.2008
CESCATO RENZO ET AL: "Bombesin receptor antagonists may be preferable to agonists for tumor targeting" JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, vol. 49, no. 2, February 2008 (2008-02), pages 318-326.
TOKITA K ET AL: "Molecular basis for selectivity of high affinity peptide antagonists for the gastrin-releasing peptide receptor" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 276, no. 39, 28 September 2001 (2001-09-28), pages 36652-36663/
MANTEY SAMUEL A ET AL: "Discovery of a high affinity radioligand for the human orphan receptor, bombesin receptor subtype 3, which demonstrates that it has a unique pharmacology compared with other mammalian bombesin receptors" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 272, no. 41, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 26062-26071.
RADULOVIC E.A.: "Biological effects and receptor binding affinities of new pseudononapeptide bombesin/GRP receptor antagonists with N-terminal D-Trp or D-Tpi" INT. J. PEPTIDE PROTEIN RES., vol. 38, 1991, pages 593-600.
COY D ET AL: "SHORT CHAIN BOMBESIN PSEUDOPEPTIDES WITH POTENT BOMBESIN RECEPTOR ANTAGONIST ACTIVITY IN RAT AND GUINEA-PIG PANCREATIC ACINAR CELLS" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 190, no. 1-2, 1990, pages 31-38
AZAY J ET AL: "COMPARATIVE STUDY OF IN VITRO AND IN VIVO ACTIVITIES OF BOMBESIN PSEUDOPEPTIDE ANALOGS MODIFIED ON THE C-TERMINAL DIPEPTIDE FRAGMENT" PEPTIDES, ELSEVIER, AMSTERDAM, vol. 19, no. 1, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 57-63.
WANG XUEJUAN ET AL: "A new highly potent DOTA-conjugated bombesin antagonist for GRPr-positive tumor targeted imaging" JOURNAL OF PEPTIDE SCIENCE, vol. 14, no. 8, Suppl. S, August 2008 (2008-08), page 154.

(54) КОН'ЮГАТИ АНТАГОНІСТА ПЕПТИДУ АНАЛОГА БОМБЕЗИНУ**(57) Реферат:**

Для забезпечення діагностичного й терапевтичного лікарського засобу, заявляється кон'югат антагоніста пептиду аналога бомбезину, який має загальну формулу (I),
(I) $[A-(B)_n]_x-C$,

UA 103314 C2

де А являє собою хелатор металу, що містить принаймні один радіонуклідний метал, В являє собою спейсер, зв'язаний з N-кінцем С, або ковалентний зв'язок, і С являє собою антагоніст пептиду аналога бомбезину, що має послідовність, де додатково х являє собою ціле число від 1 до 3 і n являє собою ціле число від 1 до 6.

Винахід належить до терапевтичних або діагностичних/візуалізуючих радіофармацевтичних засобів, препарату і їх застосування, де терапевтичні або діагностичні радіофармацевтичні засоби визначаються як зв'язувальні фрагменти, які мають спорідненість до й здатні зв'язуватися з рецепторами бомбезину й більш переважно з рецептором пептиду, що вивільняє гастрин (GRP). Зв'язувальні фрагменти мітять за допомогою метал-комплексоутворювальної групи для ізотопів, які випромінюють альфа-, бета-, гамма-промені і позитрони. Застосування охоплює обробку суб'єкта, що має новоутворення, що включає стадію введення суб'єктові ефективною кількістю терапевтичного радіофармацевтичного засобу, що має метал, хелатований з хелатоутворювальною групою, приєднаною до фрагмента, здатного зв'язуватися з рецепторами бомбезину й, більш переважно, з рецептором пептиду, що вивільняє гастрин (GRP), який понадекспресується на пухлинних клітинах. Застосування включає діагностування або візуалізацію суб'єкта, що має новоутворення, використовуючи діагностичний/візуалізуючий радіофармацевтичний засіб, що має метал, хелатований з хелатоутворювальною групою, приєднаною до фрагмента, здатного зв'язуватися з рецепторами бомбезину й, більш переважно, з рецептором пептиду, що вивільняє гастрин (GRP), який понадекспресується на пухлинних клітинах. Спосіб включає створення терапевтичної або діагностичної сполуки зі сполуки-попередника, що включає метал-хелатоутворювальну групу, ковалентно зв'язану із фрагментом, здатним зв'язуватися з рецепторами бомбезину й, більш переважно, з рецептором пептиду, що вивільняє гастрин (GRP).

Передумови створення винаходу

При створенні ефективного радіофармацевтичного індикатора для застосування як діагностичний засіб, є надзвичайно важливим, щоб лікарські засоби мали підходящі націлювальні і фармакокінематичні властивості в умовах *in vivo*. Fritzberg та ін. (1992, J. Nucl. Med., 33:394) додатково вказують на те, що радіонуклідна хімія й асоційовані зв'язування потребують оптимізації приєднання й мічення хімічних модифікацій носія біологічної молекули. Отже, тип радіонукліда, тип біомолекули й спосіб, використовуваний для їх зв'язування один з одним, можуть виявляти дуже важливий вплив на властивості радіоактивного індикатора.

Пептиди є біомолекулами, які приймають надзвичайно важливу участь у багатьох фізіологічних процесах, включаючи дії як нейромедіатори, гормони і антибіотики. У дослідженнях була показана їх значимість у таких галузях, як нейробіологія, імунологія, фармакологія й клітинна біологія. Деякі пептиди можуть діяти як хімічний месенджер. Вони зв'язуються з рецептором на поверхні клітини-мішені й біологічна дія ліганду передається в цільову тканину. Отже, властивість зв'язування ліганду зі специфічним рецептором може використовуватися шляхом мічення ліганду за допомогою радіонукліда. Теоретично, висока афінність ліганду до рецептора полегшує утримання радіоактивно міченого ліганду в тканинах, які експресують рецептор. Проте, зараз усе ще проводяться дослідження щодо того, які пептиди можуть бути ефективно мічені й у яких умовах слід вводити мітку. Добре відомо, що специфічність рецептора до пептиду ліганду може змінюватися при здійсненні хімічної реакції. Тому необхідно визначити оптимальну пептидну конструкцію.

Пухлини понадекспресують рецептори різних типів, з якими специфічно зв'язуються пептиди. У наступних публікаціях Boerman та ін., Seminar in Nuclear Medicine, 2000, 30(3), 195; Reubi та ін. J. Nucl. Med., 2005, 46, (доп. 1) 67S; Reubi, J.C., Endocrine Reviews, 2003, 24(4), 389 наведений неповний перелік пептидів, які специфічно зв'язуються з рецепторами поверхні клітин у новоутвореннях, тобто, соматостатин, вазоактивний пептид кишечника (VIP), бомбезин, що зв'язується з рецептором пептиду, що вивільняє гастрин (GRP), гастрин, холецистокінін (CCK) і кальцитонін.

Потенційна корисність специфічних до рецепторів пептидів, мічених металом, для сцинтиграфічної візуалізації й променевої терапії пояснюється на прикладах аналогів соматостатину, наприклад, ^{111}In -DTPA кон'югований Октреотид, дозволений FDA діагностичний візуалізуючий засіб, Octreoscan®, який випускається Covidien у США (Lowbertz та ін., Seminars in Oncology, 1994, 1) і Reubi та ін., J. Nucl. Med., 2005, 46, 67S-75S і посилання, наведених у цих джерелах, відповідно. Октреотид і його аналоги ковалентно зв'язані з візуалізуючими ізотопами деяких металів ($^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{68}Ga) і з терапевтичними ізотопами металів (^{105}Rh , $^{186/188}\text{Re}$, ^{153}Sm , ^{90}Y , ^{166}Ho , ^{177}Lu). Кон'югати, мічені металами, специфічно зв'язуються з рецептором, і при зв'язуванні з рецептором, конструкція інтерналізується рецептором і мічені металом специфічні для рецептора пептиди або їх метаболіти захоплюються клітинами-мішенями.

Вищевказаний принцип надалі поширюється на пептиди, авідні до рецептора GRP (пептиди, які мають високу афінність до рецептора), у яких для сцинтиграфічної візуалізації й променевої терапії використовуються агоністи бомбезину, кон'юговані з металами. (Smith та ін., Anticancer Res., 23 (2003), 63–70; Baidoo та ін., Bioconjug. Chem., 9 (1998), 218–225; Galí та ін., Bioconjug.

Chem., 12 (2001), 354–363; Smith та ін., Bioconjug. Chem., 14 (2003), 93–102, Cancer Res., 63 (2003), 4082–4088; Rogers та ін., In, M. Nicolini і U. Mazzi, Editors, Technetium, rhenium and other metals in chemistry and nuclear medicine, SGE Editoriali, Italy (1999), 519–525; Zhang та ін., Cancer Res., 64 (2004), 6707–6715; Lantry та ін., EANM, Helsinki (Finland) (2004); Linder та ін., J. Nucl. Med., 45, (2004) (5), 169P [реферат 482]. Chen та ін., J. Nucl. Med., 45 (2004), 1390–1397; Johnson та ін., Cancer Biother Radiopharm. 2006, 21(2), 155-66, Smith та ін., Nucl. Med. Biol., 2005, 32 733-40).

В Chen та ін. (Appl. Radiat. Isot., 2007, (In Press)), Waser та ін. (Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2007 34, 95-100) і Lantry та ін. (J. Nucl. Med., 2006, 47, 1144-52) описали візуалізацію й радіотерапію за допомогою агоніста бомбезину, ^{177}Lu -DOTA, зв'язаного з -NH-CH₂-CO-[4-амінобензоїл]-QWAVGHLM-NH₂) (^{177}Lu -AMBA).

Деякі патенти й патентні заявки стосуються агоністів бомбезину, мічених металами. Volkert та ін. (US 2007/0065362 A) заявляють агоністи бомбезину, мічені металами загальної структури

Фрагмент, мічений металом-спейсерна група-агоніст бомбезину для візуалізації й терапевтичного застосування. Інші патенти й патентні заявки цих же винахідників включають: US 6,921,526 B (2005), US 7,060,247 B, US 7,147,838 B (2006) і WO 2002/087631 A1.

Рівень техніки

Принцип, що лежить в основі вибору агоністів як радіофармацевтичного засобу у всіх вищевказаних публікаціях, полягає в тому, що вони продукують або проявляють відповідь за допомогою GRP рецепторів при взаємодії, де радіофармацевтичний засіб після цього інтерналізується усередину клітини за допомогою ендоцитозу. GRP антагоністи протидіють ефекту агоніста й не інтерналізуються в клітини й, отже, вважається, що антагоністи не є придатними для радіосцинтиграфічної візуалізації й радіотерапевтичних цілей. Аж до теперішнього часу загальноприйнята думка полягала в розробці сполук із властивостями хорошої інтерналізації радіоактивного ліганду, що приводило до високого накопичення в умовах *in vivo* радіоактивних лігандів у пухлинах, що, як вважалося, було необхідним для оптимальної візуалізації й радіонуклідної терапії в умовах *in vivo*. З молекулярно-фармакологічних досліджень добре відомо, що ефективна інтерналізація звичайно забезпечується агоністами (Bodei та ін., J. Nucl. Med., 2006;47, 375–377; Koenig та ін., Trends Pharmacol. Sci., 1997;18, 276–287, Cescato та ін., J. Nucl. Med., 2006;47, 502–511. Ginj та ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006; 103, 16436–16441) і недавно, було показано, що для рецепторів соматостатину, високоафінні антагоністи рецепторів соматостатину, мічені металами, погано інтерналізуються в пухлинні клітини й забезпечують еквівалентне або навіть краще в умовах *in vivo* поглинання в пухлину на моделях пухлин у тварин у порівнянні з відповідними агоністами, які чудово інтерналізуються. GRP рецептори понадекспресуються в деяких новоутвореннях (Cornelio та ін., Ann. Onco., 2007, 18, 1457-1466 і посилання, наведені в цьому джерелі), таких як рак і метастази передміхурової залози, рак і метастази молочної залози, шлунково-кишкові стромальні пухлини, дрібноклітинний рак легені, нирковоклітинний рак, нейроендокринні пухлини шлунково-кишкового тракту й підшлункової залози, плоскоклітинний рак голови й шиї, нейробластоми й плоскоклітинний рак стравоходу. GRP рецептори також понадекспресуються в зв'язаних з пухлинами кровоносних судинах раку яєчників, ендометрію й підшлункової залози людини. (Fleischmann та ін., Cell Onc., 2007, 29, 421-33). Отже, надзвичайно важливим є створення потенційних радіофармацевтичних засобів з антагоністичними властивостями для візуалізації й радіотерапії.

Jensen та ін. (Pharma. Reviews, 2008 (готується до друку)) недавно описали фармакологію рецепторів трьох різних підтипів рецептора бомбезину, де GRP рецептор належить до підтипу 2.

У недавній публікації Cescato та ін. (J. Nucl. Med., 2008, 49, 318-26) показали, що $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -N₄-мічений антагоніст бомбезину може бути переважним у порівнянні з агоністами для націлювання на пухлині.

Більш ранні винаходи в галузі сполук, націлених на GRP-рецептор, описані в WO 2007/109475 A2, WO 2007/095443 A2, US 2008/0008649 A1 і US 7,226,577 B2 з хелатоутворювальним металом-лінкером-бомбезином із загальною схемою, представленою нижче.

Хелатор-лінкер - аналог бомбезину

Відповідно до WO 2007/095443 A2, L70 зразок із переважною послідовністю ^{177}Lu -DOTA-Gly-4-амінобензоїл-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂ проявляє себе як агоніст, де вимірюють поглинання через 1 і 24 години. Поглинання не є оптимальним для терапевтичних цілей і потребує поліпшення.

Крім цих патентів і заявок, були опубліковані доклінічні й клінічні дослідження (Waser та ін., Eur. J. Nucl. Medicine, 2007, 34, 95-100; J. Nucl. Med., 2006, 47, 1144-52).

Відповідно до вибору антагоніста, який націлений на GPR рецептор у різному сайті з високою спорідненістю, у даному винаході було показано, що комбінація стратегії спейсеру
5 приводить до несподівано високого й персистуючого поглинання пухлинами, у комбінації з низьким поглинанням і швидким кліренсом в органах, що не є мішенями. У порівняльному дослідженні, спостерігали значно більш високе поглинання (> 2 X) у пухлині при використанні подібного лінкеру. Виходячи з досліджень в умовах *in vitro*, що підтверджують вірогідність антагоністичних властивостей аналогів бомбезину, було виявлено, що навіть після додавання
10 N-кінцевого спейсеру, хелатору й металу, ці антагоністичні дії зберігаються й передаються з дуже гарними характеристиками в умовах *in vivo*, що стосується співвідношень пухлина-фон.

Таким чином, задачею даного винаходу є забезпечення нових кон'югатів антагоніста пептиду бомбезину, які проявляють високе поглинання й високу стабільність в умовах *in vivo* (сироватка й тканини людини).

15 Суть

Опис винаходу

У першому аспекті, винахід стосується кон'югатів антагоніста пептиду аналога бомбезину, які селективно зв'язуються з рецепторами бомбезину й більш переважно з рецептором GRP без запуску інтерналізації в клітину й без передачі сигналів шляхом мобілізації кальцію, при цьому
20 протидіючи ефектам, індукованим агоністом у цих двох системах, де кон'югат антагоніста пептиду аналога бомбезину має загальну формулу (I):

$[A-(B)_n]_x-C$

(I)

де

x являє собою ціле число від 1 до 3,

n являє собою ціле число від 1 до 6,

25 A являє собою хелатор металу, що містить принаймні один радіонуклідний метал, переважно придатний для діагностичного або терапевтичного застосування, більш переважно для візуалізації або променевої терапії,

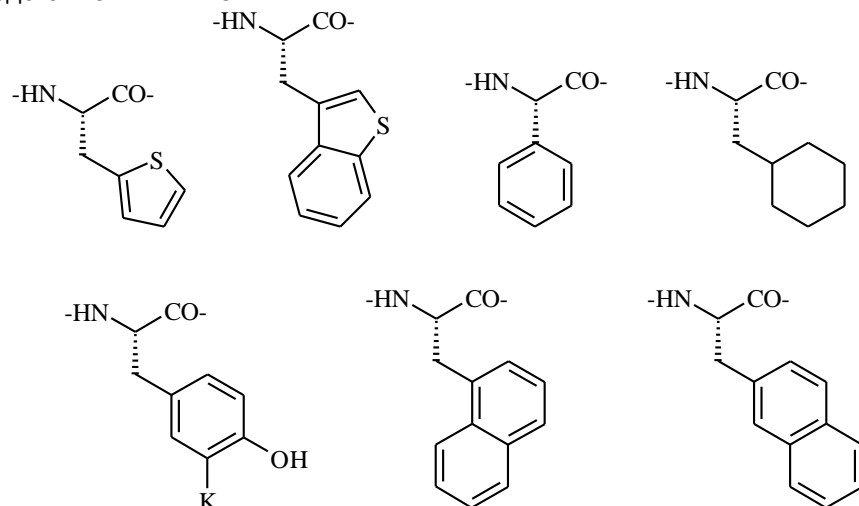
B являє собою спейсер, зв'язаний з N-кінцем C, або ковалентний зв'язок,

C являє собою антагоніст пептиду аналога бомбезину з послідовністю C-1 - C-4, де

30 C-1: Xaa¹₆-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa¹¹₂-His¹²-Xaa¹³₃-Xaa¹⁴₄-Z¹⁴H,

де

Xaa₁ являє собою D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp або залишок, що має будь-яку з формул, представлених нижче:



35 K являє собою F, Cl, I, або NO₂,

Xaa₂ являє собою Gly або β-Ala,

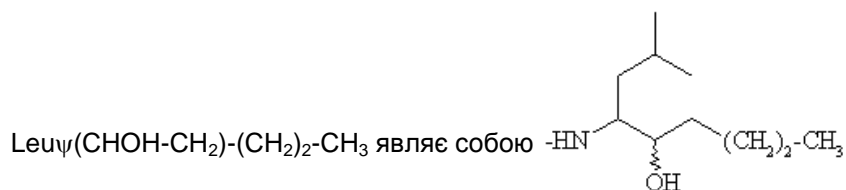
Xaa₃ являє собою статин, аналоги й ізомери статину, 4-Am,5-MeHpa, 4-Am,5-MeHxA або α-заміщені амінокислоти,

Xaa₄ являє собою Leu, Cpa, Cba, CpnA, Cha, t-buGly, tBuAla, Met, Nle, або ізо-Bu-Gly, і

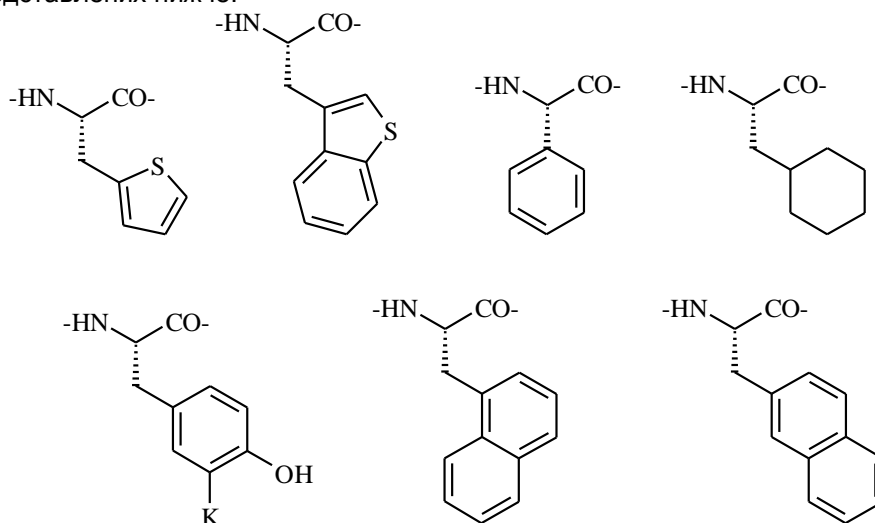
40 Z являє собою NH або O;

C-2: Xaa⁶₁-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa¹¹₂-His¹²-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃,

де



Хаа₁ являє собою D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp або залишок, що має будь-яку з формул, представлених нижче:



5

i

К являє собою F, Cl, I, або NO₂,

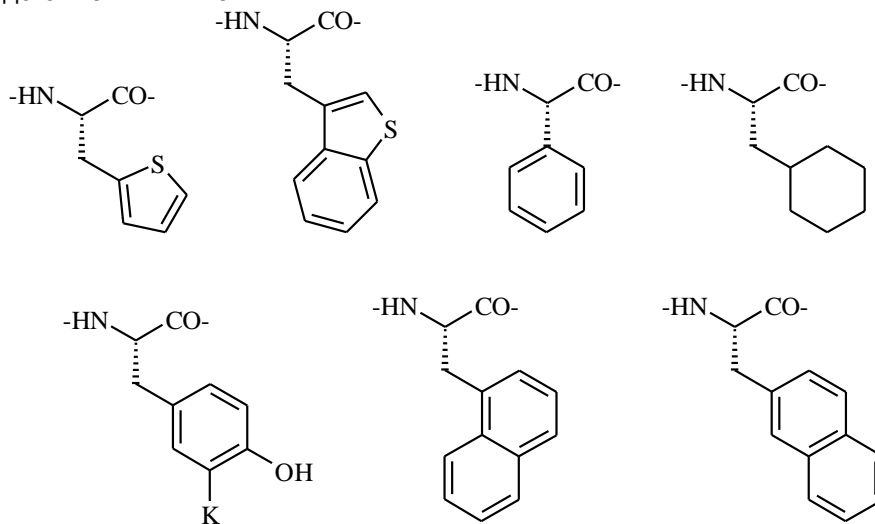
Хаа₂ являє собою Gly або β-Ala;

С-3: Хаа₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Хаа₂¹¹-His¹²-Хаа₅¹³-Хаа₆¹⁴-ZH,

де

10

Хаа₁ являє собою D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp або залишок, що має будь-яку з формул, представлених нижче:



К являє собою F, Cl, I, або NO₂,

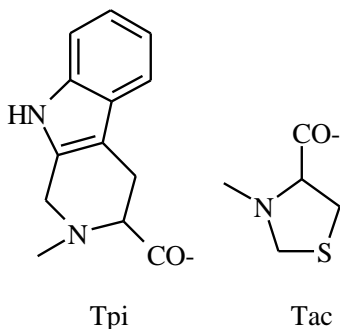
Хаа₂ являє собою Gly або β-Ala,

15

Хаа₅ являє собою Leuψ-CH₂NH-

Хаа₆ являє собою Cys, Phe, Trp, Трі або Тас,

де Трі і Тас мають наступні значення:



i

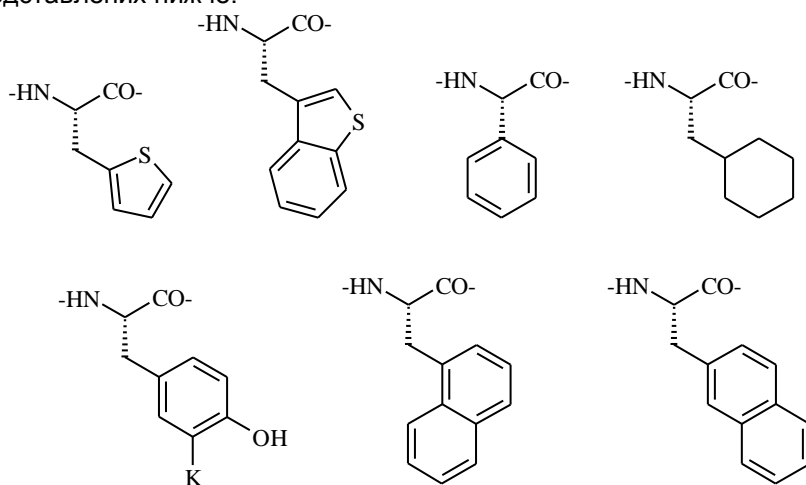
Z являє собою NH, або O;

C-4: Xaa⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa¹¹-His¹²-Xaa⁷,

5

де

Xaa₁ являє собою D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp або залишок, що має будь-яку з формул, представлених нижче:

K являє собою F, Cl, I, або NO₂,

10

Xaa₂ являє собою Gly або β-Ala,Xaa₇ являє собою Leu-O-Алкіл, або Leu-NH-алкіл.

Винахід також стосується їх фармацевтично прийнятних солей цих кон'югатів антагоніста пептиду аналога бомбезину неорганічних або органічних кислот, а також гідратів, комплексів, складних ефірів, амідів, сольватів і проліків цих сполук, що мають загальну хімічну формулу (I).

15

Опис А (хелатор металу):

У переважному варіанті здійснення даного винаходу, хелатор металу (А) являє собою хелатор металу для тривалентних металів або для п'ятивалентних металів і їх близькі аналоги.

Переважно, хелатор металу (А) для тривалентних металів вибирають із групи, яка включає:

Хелатори на основі DOTA, NODASA, NODAGA, NOTA, DTPA, EDTA, TETA і TRITA і їх

20

близькі аналоги,

де

DOTA являє собою 1,4,7,10-тетраазаціклододекан-N,N',N'',N''' тетраоцтову кислоту,

DTPA являє собою діетилентриамінпентаоцтову кислоту,

EDTA являє собою етилендіамін-N,N'-тетраоцтову кислоту,

25

TETA являє собою 1,4,8,11-тетраазаціклододекан-1,4,8,11-тетраоцтову кислоту, і

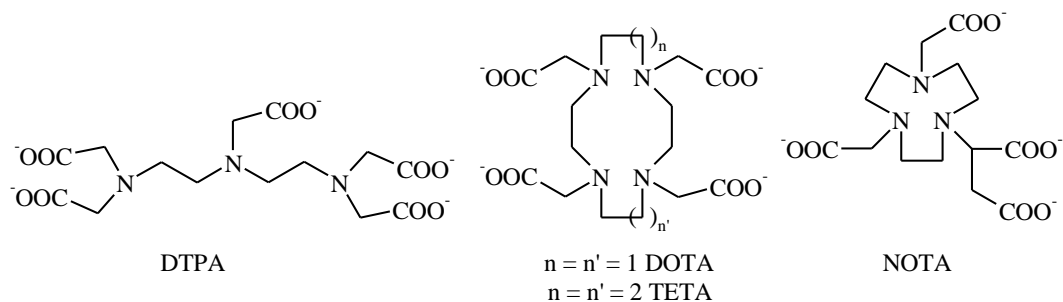
NOTA являє собою 1,4, 7-триазаціклононан-1,4,7-триацетатооцтову кислоту.

Більш переважно, хелатор металу (А) для тривалентних металів вибирають із групи, яка включає:

хелатори на основі DOTA, NOTA, DTPA і TETA та їх близькі аналоги.

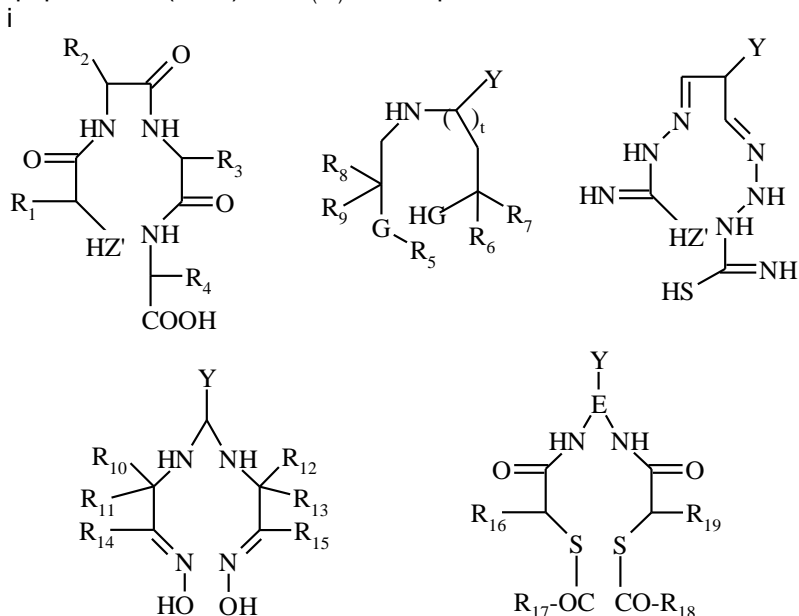
30

Структури цих хелатоутворювальних лігандів у їх повністю депротонованій формі представлені нижче.



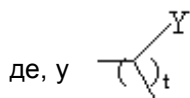
Ще більш переважно, хелатор металу (A) для тривалентних металів вибирають із групи, яка включає DTPA (діетилентриамінпентаоцтова кислота) і поліаза-полікарбоксилат макроцикли, такі як DOTA (1,4,7,10-тетраазаціклододекан-N,N',N'',N''' тетраоцтова кислота) і їх близькі аналоги.

Переважно, хелатор металу (A) для п'ятивалентних металів вибирають із групи, яка включає 2-гідразино нікотинамід (HYNIC), N_4 -хелатори, N_4 -X (N_4 може бути лінійним або макроциклічним і X може представляє собою азид амін, OH, галоген, о-, м-, п-аміно бензил метабаракарбоксибензил, і карбокси (Nock, B. та ін. (2003 [^{99m}Tc]Demobesin 1, a novel bombesin analogue for GRP receptor-targeted tumour imaging. Eur. J. Nucl. Mol. Imaging, 30, 247-258)), Десферіоксамін (DFO), і $N_rS_{(4-r)}$ хелатори.



де

R_1 - R_{15} незалежно один від одного являють собою атоми водню або (C_1 - C_4) алкільні групи,



фрагменті вищенаведеної формули, t являє собою 1 або 2 або 3 і принаймні

один з атомів вуглецю у вказаному фрагменті заміщений за допомогою Y або

незаміщений за допомогою Y,

R_{16} являє собою атом водню або CO_2 (C_1 - C_4) алкільну групу;

R_{17} і R_{18} незалежно один від одного являють собою (C_1 - C_4) алкільні групи або фенільні групи;

R_{19} являє собою $\text{CH}_2\text{-COOH}$ або його функціональне похідне;

E являє собою (C_1 - C_4) алкілен, або фенілен;

необов'язково (C_1 - C_4) алкілен, заміщений за допомогою CO_2 -алкілу, $\text{CH}_2\text{-CO}$ алкілу, CONH_2 , або $\text{CONHCH}_2\text{-CO}_2$ -алкілу;

необов'язково фенілен, заміщений за допомогою CO_2 -алкілу,

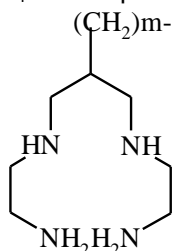
де алкільні групи мають від 1 до 4 атомів вуглецю;

G являє собою NH або S;

Y являє собою функціональну групу, здатну зв'язуватися з вільною аміногрупою пептиду (N-кінця) або зі спейсером; і

5 Z' являє собою S або O.

N₄-хелатори переважно являють собою,



де

m являє собою ціле число від 1 до 4.

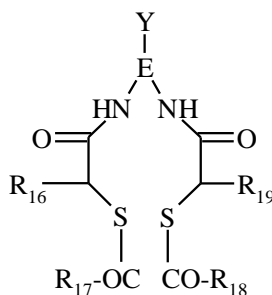
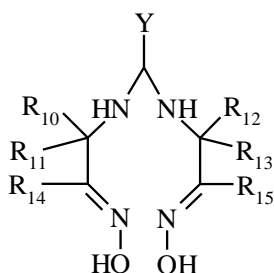
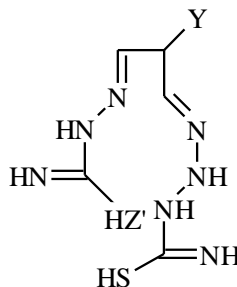
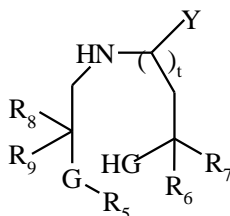
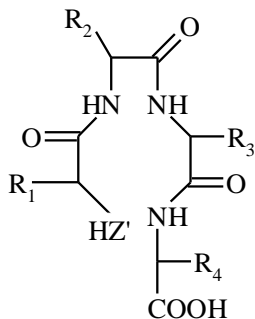
10 N_tS_(4-t) хелатори визначаються, де t являє собою ціле число від 1 до 4.

Вказана функціональна група Y переважно включає ізоціанато, азотіоціанато, форміл, галонітрофеніл, діазоній, епоксид, трихлор-s-триазиніл, етиленіміно, хлорсульфоніл, алкоксикарбонімідоїл, (заміщений або незаміщений) алкілкарбонілоксикарбоніл, алкілкарбонілімідазоліл, сукцинімідо-оксикарбоніл; де вказана група приєднана до (C₁-C₁₀) вуглеводневого бірадикала. Підходящими прикладами вуглеводневих бірадикалів є бірадикали, похідні бензолу, (C₁-C₆) алканів, (C₂-C₆) алкенів і (C₁-C₄)-алкілбензолів, і їх близькі аналоги.

Переважно N_tS_(4-t) хелатори вибирають із групи, яка включає

20 хелатори на основі бісаміно бістіолу (BAT) для радіонуклідного металу технецію, меркапто-ацетил-гліцил-гліцил-гліцин (MAG3) для радіонуклідного металу технецію і їх близькі аналоги.

Більш переважно, хелатор металу (A) для п'ятивалентних металів вибирають із групи, яка включає



25 і їх близькі аналоги,

де R₁-R₁₉, Z', Y, G і t мають значення, вказані вище.

Переважно, t являє собою ціле число від 2 до 4 і більш переважно t являє собою 2 або 3.

Переважно, m являє собою ціле число від 1 до 2, більш переважно m являє собою 1.

30 Добре відомі хелатори металів, такі як лінійні, макроциклічні, тетрапіридинові й N₃S, N₂S₂ або N₄ хелатори описані в US 5,367,080 A, US 5,364,613 A, US 5,021,556 A, US 5,075,099 A, US 5,886,142 A, розкриття яких повністю включене в дану заяву як посилання.

Добре відомі хелатори металів, такі як хелатори на основі HYNIC, DTPA, EDTA, DOTA, TETA, бісаміно бістіолу (BAT), описані в US 5,720,934 A, розкриття якого повністю включене в дану заявку як посилання.

Добре відомі хелатори металів, такі як Десферіоксамін (DFO), описані Doulias та ін. (2003) Endosomal and lysosomal effects of desferrioxamine: protection of Hela cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage and induction of cell-cycle arrest. Free Radic. Biol. Med., тому 35, випуск 7:719-28.

Доступні різні хелатоутворювальні засоби й вони описані Banerjee та ін., (Nucl. Med. and Biology, 2005, 32, 1-20 і посилання, наведені в цьому джерелі), які включені в дану заявку шляхом посилання.

2-гідразіно нікотинамід (HYNIC) являє собою інший клас хелатоутворювальної групи (A), у присутності співліганду, який широко використовується для інкорпорації ^{99m}Tc і $^{186,188}\text{Re}$ (Schwartz та ін. Bioconj. Chem., 1991, 2, 333-6; Babich та ін., J. Nucl. Med., 1993, 34, 1964-70; Nucl. Med. Biol., 1995, 22, 25-30; Nucl. Med. Biol., 1995, 22, сс. 32, сс. 1-10)

DTPA використовується в Octreoscan® (що випускається на ринок Covidian) для комплексоутворення ^{111}In і деякі модифікації описані в літературі (Brechtel та ін., Bioconj. Chem., 1991, 2, 187-194; Li та ін., Nucl. Med. Biol., 2001, 28, 145-154).

Хелати DOTA типу для застосування при променевої терапії описані Tweedle та ін., Патент US 4885363. Інші поліаза макроцикли для хелатоутворення з ізотопами тривалентних металів описані Maeske та ін. в Bioconj. Chem., 2002, 13, 530 і включені в дану заявку шляхом посилання.

N_4 -хелатори, ^{99m}Tc - N_4 -хелатор використовується для мічення пептидів у випадку мінігастрину для націлювання на ССК-2 рецептори (Nock та ін., J. Nucl. Med., 2005, 46, 1727-36).

У переважному варіанті здійснення даного винаходу, радіонуклідний метал придатний для комплексоутворення з хелатором металу й приводить до одержання радіоактивного хелатору металу для візуалізації. Переважно, радіонуклідний метал вибирають із групи, яка включає ^{133m}In , ^{99m}Tc , ^{67}Ga ,

^{52}Fe , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{111}In , ^{97}Ru , ^{203}Pb , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{51}Cr , ^{52m}Mn , ^{157}Gd , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{64}Cu і ^{82}Br . Більш переважно, радіонуклідний метал вибирають із групи, яка включає ^{99m}Tc , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , і ^{123}I . Ще більш переважно радіонуклідний метал являє собою ^{68}Ga . Ще більш переважно радіонуклідний метал являє собою ^{99m}Tc .

У переважному варіанті здійснення даного винаходу, радіонуклідний метал придатний для комплексоутворення з хелатором металу й приводить до одержання радіоактивного хелатору металу для променевої терапії. Переважно, радіонуклідний метал вибирають із групи, яка включає ^{186}Re , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{68}Ga , ^{69}Er , ^{121}Sn , ^{127}Te , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{161}Tb , ^{109}Pd , ^{188}Re , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{77}As , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{149}Pm , ^{151}Pm , ^{153}Sm , ^{159}Gd , ^{172}Tm , ^{90}Y , ^{111}In , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Lu , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{125}I , ^{123}I , ^{213}Bi , ^{225}Ac , ^{129}I , ^{64}Cu і ^{177m}Sn . Більш переважно, радіонуклідний метал вибирають із групи, яка включає ^{186}Re , ^{188}Re , ^{90}Y , ^{153}Sm , ^{68}Ga , і ^{177}Lu .

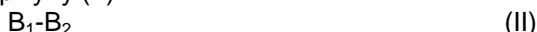
У подальшій альтернативі першого аспекту радіонуклідний метал являє собою радіоактивний галоген (ізотопи йоду й броду), радіоактивний галоген зв'язується безпосередньо з пептидом, наприклад, шляхом хімічної реакції з Tyr або Trp фрагментом у пептиді, або необов'язково A може представляє собою Tyr або Trp.

Переважні радіодіагностичні засоби (^{67}Ga , ^{111}In) і радіотерапевтичні засоби (^{90}Y , ^{153}Sm , ^{177}Lu) необов'язково містять хелатований +3 іон металу із класу елементів, відомих як лантаноїди. Типові радіоактивні метали в цьому класі включають ізотопи ^{90}Y , ^{111}In , ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{153}Eu , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{149}Pm , ^{151}Pm , ^{153}Sm , ^{159}Gd , ^{172}Tm , ^{90}Y , ^{111}In , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Lu , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{125}I , ^{123}I , ^{213}Bi , ^{225}Ac , ^{129}I , ^{64}Cu і ^{177m}Sn . Більш переважно, радіонуклідний метал вибирають із групи, яка включає ^{186}Re , ^{188}Re , ^{90}Y , ^{153}Sm , ^{68}Ga , і ^{177}Lu .

Опис В (спейсер):

В являє собою спейсер, зв'язаний з N-кінцем С, або ковалентний зв'язок.

У переважному варіанті здійснення даного винаходу В являє собою сполуку, що має формулу (II)



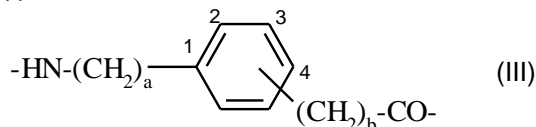
де

B_1 представляє собою ковалентний зв'язок, амінокислоту, яка зустрічається в природі, амінокислоту, яка не зустрічається в природі, лінійний діамін або циклічний діамін,

B_2 представляє собою ковалентний зв'язок, амінокислоту, яка зустрічається в природі, амінокислоту, яка не зустрічається в природі, лінійну карбонову кислоту або циклічну карбонову кислоту

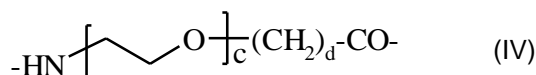
за умови, що обидва B_1 й B_2 не можуть одночасно представляє собою ковалентний зв'язок й що, коли B_1 представляє собою діамін, то B_2 представляє собою карбонову кислот (тобто, B_2 не може представляє собою зв'язок або амінокислоту, яка зустрічається в природі, або амінокислоту, яка не зустрічається в природі, в цьому випадку)

- 5 Переважно, амінокислота, що не зустрічається в природі, представляє собою сполуку, яка має будь-яку з формул (III), (IV), (V) або де



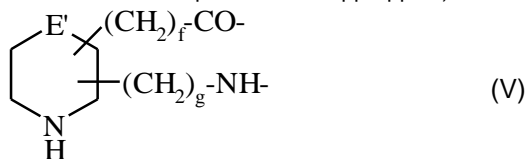
де

- 10 а являє собою ціле число від 0 до 3,
b являє собою ціле число від 0 до 3,
і відносні схеми заміщення або необов'язково 1,2-, 1,3- або 1,4-
Переважно,
а являє собою 0 або 1,
b являє собою 0 або 1,



де

- 15 с являє собою ціле число від 1 до 24,
d являє собою ціле число від 1 до 6.
Переважно,
с являє собою ціле число від 1 до 15, більш переважно с рівний від 1 до 8,
20 d являє собою ціле число від 1 до 3, більш переважно d рівний 1 .

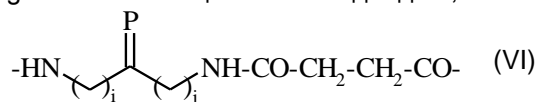


де

- E' являє собою NH, або CH₂,
f являє собою ціле число від 0 до 6,
g являє собою ціле число від 0 до 6;
25 коли E' являє собою CH₂, то 6-ти членне кільце необов'язково заміщене в будь-якому положенні вуглецю 6-ти членного кільця на тому ж самому вуглеці кільця або на різних вуглецях,
коли E' являє собою NH, то 6-ти членне кільце необов'язково заміщене в будь-якому положенні вуглецю 6-ти членного кільця на тому ж самому атомі вуглецю кільця або на різних атомах вуглецю та/або на атомі азоту за умови, що f або g являє собою ціле число, рівне або
30 більше 1.

Переважно,

- E' являє собою NH,
f являє собою ціле число від 0 до 3,
35 g являє собою ціле число від 0 до 3;



де

- i являє собою ціле число від 1 до 6,
j являє собою ціле число від 1 до 6,
P являє собою O або H₂.
40 Переважно,
i являє собою ціле число від 1 до 3,
j являє собою ціле число від 1 до 3,
P являє собою O.

Більш переважно спейсер вибирають із групи, яка включає 4-аміно-1-карбоксиметилпіперидин, (R,S)-діамінооцтову кислоту, PEG₁₋₂₄, Sar₅₋₁₀, 8-амінооктанову кислоту, 6-амінокапронову кислоту, 4-(2-аміноетил)-1-карбоксиметил піперазин, діаміномасляну кислоту, гіпурову кислоту, 4-аміно-1-Вос-піперидин-4-карбонову кислоту, Gly-амінобензойну кислоту, 5-аміно-3-окса-пентил-напівамід янтарної кислоти, Peg₁₋₂₄-4-аміно-1-карбоксиметил піперидин, Dab(шикимову кислоту), (D-Gln)x, (D-Asn)x.

Опис С (послідовність антагоніста пептиду аналога бомбезину)

У переважному варіанті здійснення даного винаходу, послідовність антагоніста пептиду аналога бомбезину вибирають із групи, яка включає С-1 - С-3, переважно С-1 - С-2.

Переважно, послідовність антагоніста пептиду аналога бомбезину вибирають із групи, яка включає:

Посл. сполуки 1: D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

Посл. сполуки 9: D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃;

Посл. сполуки 12: D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-Phe-NH₂;

Посл. сполуки 13: D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-Cys-NH₂.

Переважно, кон'югат антагоніста пептиду аналога бомбезину, що має формулу (I), що містить принаймні один радіонуклідний метал, вибирають із групи, яка включає

Сполука 1: DOTA-Gly-амінобензоїл-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

Сполука 2: DOTA-4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

Сполука 3: DOTA-4-аміно-1-піперидин-4-карбонова кислота-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

Сполука 4: DOTA-15-аміно-4,7,10,13-тетраоксапентадеканова кислота-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

Сполука 5: DOTA-(15-аміно-4,7,10,13-тетраоксапентадеканова кислота)-(4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин)-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

Сполука 6: DOTA-діаміномасляна кислота-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

Сполука 7: DOTA-4-(2-аміноетил)-1-карбоксиметил-піперазин-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

Сполука 8: DOTA-(5-аміно-3-окса-пентил)-напівамід янтарної кислоти-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂;

Сполука 9: DOTA-4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃;

Сполука 10: DOTA-(15-аміно-4,7,10,13-тетраоксапентадеканова кислота-4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин)-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃;

Сполука 11: DOTA-15-аміно-4,7,10,13-тетраоксапентадеканова кислота -D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃;

Сполука 12: DOTA-4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-Phe-NH₂;

Сполука 13: DOTA-4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-Cys-NH₂;

Сполука 14: N₄-триазили-dPEG₁-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂.

Інші переважні варіанти здійснення:

У переважному варіанті здійснення даного винаходу, для сполуки, що має формулу (I), х являє собою ціле число від 1 до 2, переважно х являє собою 1.

Якщо х рівний або більше 2, то (B)_n являє собою лінійний спейсер або розгалужений, зв'язаний з N-кінцем антагоніста пептиду аналога бомбезину (C).

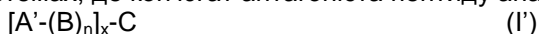
У переважному варіанті здійснення даного винаходу, для сполуки, що має формулу (I), n являє собою ціле число від 1 до 4, переважно n являє собою 1 або 3, більш переважно 1.

У переважному варіанті здійснення даного винаходу, для сполуки, що має формулу (I), А додатково являє собою хелатор металу, що містить принаймні один атом холодного металу, що відповідає або еквівалентний до перерахованого вище радіонуклідному металу. Такі сполуки придатні для досліджень зв'язування в умовах in-vitro in-vivo і як порівняльні сполуки. Перераховані вище переважні варіанти здійснення винаходу застосовуються в даній заявці.

У переважному варіанті здійснення даного винаходу, для сполуки, що має формулу (I), К додатково являє собою Н або переважно Н.

У другому аспекті, винахід стосується попередників кон'югата антагоніста пептиду аналога бомбезину, які селективно зв'язуються з рецепторами бомбезину і які більш переважно зв'язуються з GRP рецептором без запуску інтерналізації в клітину й без передачі сигналів

шляхом мобілізації кальцію, при цьому протидіючи ефектам, індукованим агоністом у цих двох системах, де кон'югат антагоніста пептиду аналога бомбезину має загальну формулу (I')



де

x являє собою ціле число від 1 до 3,

5 n являє собою ціле число від 1 до 6

A' являє собою хелатор металу,

B являє собою спейсер, зв'язаний з N-кінцем C, або ковалентний зв'язок,

C являє собою антагоніст пептиду аналога бомбезину з послідовністю C-1 - C-4.

10 Хелатор металу A' являє собою хелатор металу без радіонуклідного металу, як визначено в першому аспекті для A.

Спейсер B і антагоніст пептиду аналога бомбезину C мають значення, вказані вище в першому аспекті.

Винахід також стосується них фармацевтично прийнятних солей кон'югатів антагоніста пептиду аналога бомбезину неорганічних або органічних кислот, і гідратів, комплексів, складних ефірів, амідів, сольватів і проліків цих сполук, що мають загальну хімічну формулу (I').

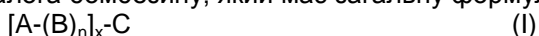
У переважному варіанті здійснення даного винаходу, x являє собою ціле число від 1 до 2, переважно x являє собою 1. Якщо x рівний або більше 2, то (B)_n являє собою лінійний спейсер або розгалужений спейсер, зв'язаний з N-кінцем антагоніста пептиду аналога бомбезину (C).

20 У переважному варіанті здійснення даного винаходу, у формулі (I'), n являє собою ціле число від 1 до 4, переважно n являє собою 1 або 3, більш переважно 1.

У третьому аспекті, винахід стосується фармацевтичної композиції, яка містить кон'югати антагоніста пептиду аналога бомбезину, які мають формулу (I) або (I'), і фармацевтично прийнятний носій.

25 У четвертому аспекті, винахід стосується застосування кон'югатів антагоніста пептиду аналога бомбезину, які мають формулу (I) або (I'), для зв'язування з рецепторами бомбезину й більш переважно рецептора пептиду, що вивільняє гастрин (GRP), та/або для інгібування рецепторів бомбезину й більш переважно рецептора пептиду, що вивільняє гастрин (GRP).

У п'ятому аспекті, винахід стосується способу приготування кон'югата антагоніста пептиду аналога бомбезину, який має загальну формулу (I)



30 де n, x, A, B і C мають значення, вказані вище, який включає стадію

- Радіоактивне хелатування кон'югата антагоніста пептиду аналога бомбезину, який має загальну формулу (I'), як визначено вище, з підходящим радіонуклідним металом або атомом металу, що відповідають радіонуклідному металу, перерахованому вище.

35 Переважно, спосіб приготування кон'югата антагоніста пептиду аналога бомбезину, який має загальну формулу (I), включає стадію радіоактивного хелатування з підходящим радіонуклідним металом.

В подальшому варіанті здійснення, спосіб приготування кон'югата антагоніста пептиду аналога бомбезину, який має загальну формулу (I)



40 де n, x, A, A', B і C мають значення, вказані вище, включає додатково стадії:

а) Сполучення спейсеру B з антагоністом пептиду аналога бомбезину C для одержання спейсеру- антагоніста пептиду аналога бомбезину з послідовністю C-1 - C-4, необов'язково повтор стадії а); і

45 б) сполучення спейсеру- антагоніста пептиду аналога бомбезину з хелатором металу A' для одержання кон'югата антагоніста пептиду аналога бомбезину, який має загальну формулу (I'), необов'язково повтор стадії б),

вищеописані стадії здійснюють перед радіохелатуванням кон'югата антагоніста пептиду аналога бомбезину, який має загальну формулу (I') з підходящим радіонуклідним металом або атомом металу, що відповідають або еквівалентним радіонуклідному металу, перерахованому вище.

У переважному варіанті здійснення даного винаходу, n, x, хелатор металу A, хелатор металу A' спейсер B і антагоніст пептиду аналога бомбезину C мають значення, вказані вище.

55 У шостому аспекті, винахід стосується способу візуалізації рецепторів бомбезину й більш переважно пухлинних клітин, які експресують GRP рецептор, та/або пухлинних і перипухлинних судин у пацієнта, який включає стадії:

- введення пацієнтові радіофармацевтично ефективної кількості кон'югата антагоніста пептиду аналога бомбезину, який має формулу (I); і
- візуалізацію радіонуклідного металу в пацієнта.

5 Переважний варіант здійснення шостого аспекту охоплює застосування радіофармацевтично ефективної кількості кон'югата антагоніста пептиду аналога бомбезину, який має формулу (I), для приготування візуалізуючого засобу для візуалізації рецепторів бомбезину й більш переважно пухлинних клітин, які експресують GRP рецептор, та/або пухлинних і перипухлинних судин.

10 У переважному варіанті здійснення пухлинні клітини стосуються злоякісних новоутворень, які вибирають із групи, яка включає:

- рак передміхурової залози, включаючи метастази,
- рак молочної залози, включаючи метастази,
- шлунково-кишкові стромальні пухлини,
- дрібноклітинний рак легені,
- 15 - нирковоклітинний рак,
- нейроендокринні пухлини шлунково-кишкового тракту й підшлункової залози,
- плоскоклітинний рак голови й шиї,
- нейробластоми, і
- плоскоклітинний рак стравоходу.

20 Ще більш переважно, пухлинні клітини стосуються злоякісних новоутворень, які вибирають із

- раку передміхурової залози, включаючи метастази, і
- раку молочної залози, включаючи метастази.

25 В подальшому переважному варіанті здійснення пухлинні й перипухлинні судини стосуються злоякісних новоутворень, які вибирають із

- раку яєчників,
- раку ендометрію, і
- раку підшлункової залози.

Переважно, пухлинні й перипухлинні судини стосуються раку яєчників.

30 У сьомому аспекті, винахід стосується способу лікування або запобігання захворювань, зв'язаних з пухлинними клітинами та/або пухлинними й перипухлинними судинами, який включає стадію:

- введення терапевтично ефективної кількості кон'югата антагоніста пептиду аналога бомбезину, який має формулу (I).

35 Переважний варіант здійснення сьомого аспекту охоплює застосування терапевтично ефективної кількості кон'югата антагоніста пептиду аналога бомбезину, який має формулу (I), для приготування лікарського засобу для лікування або запобігання захворювань, зв'язаних з пухлинними клітинами та/або пухлинними й перипухлинними судинами.

40 У переважному варіанті здійснення захворювання, зв'язані з пухлинними клітинами, стосуються злоякісних новоутворень, які вибирають із групи, яка включає:

- рак передміхурової залози, включаючи метастази,
- рак молочної залози, включаючи метастази,
- шлунково-кишкові стромальні пухлини,
- дрібноклітинний рак легені,
- 45 - нирковоклітинний рак,
- нейроендокринні пухлини шлунково-кишкового тракту й підшлункової залози,
- плоскоклітинний рак голови й шиї,
- нейробластоми, і
- плоскоклітинний рак стравоходу.

50 Ще більш переважно, захворювання, зв'язані з пухлинними клітинами, стосуються злоякісних новоутворень, які вибирають із групи, яка включає:

- рак передміхурової залози, включаючи метастази, і
- рак молочної залози, включаючи метастази.

55 В подальшому переважному варіанті здійснення захворювання, зв'язані з пухлинними й перипухлинними судинами, стосуються злоякісних новоутворень, які вибирають із групи, яка включає:

- рак яєчників,
- рак ендометрію, і
- рак підшлункової залози.

Переважно, захворювання, зв'язані з пухлинними й перипухлинними судинами, стосуються раку яєчників.

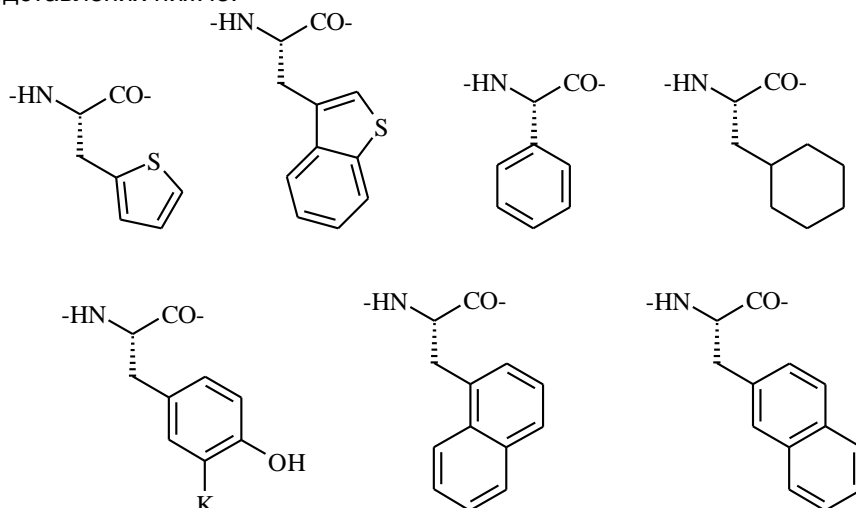
У восьмому аспекті, винахід стосується набору для препарату радіофармацевтичного засобу або радіофармацевтичного візуалізуючого засобу, який має формулу (I), де набір включає флакон, що містить заздалегідь визначену кількість кон'югата антагоніста пептиду аналога бомбезину формули (I') і прийнятний носій, розріджувач, наповнювач або ад'ювант для мічення хелатору металу радіоактивним ізотопом.

У дев'ятому аспекті, винахід стосується антагоніста пептиду аналога бомбезину з послідовністю C-1 - C-4, де

10 C-1: Хаа₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Хаа₂¹¹-His¹²-Хаа₃¹³-Хаа₄¹⁴-ZH,

де

Хаа₁ являє собою D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp або залишок, що має будь-яку з формул, представлених нижче:



15 К являє собою F, Cl, I, або NO₂,

Хаа₂ являє собою Gly або β-Ala,

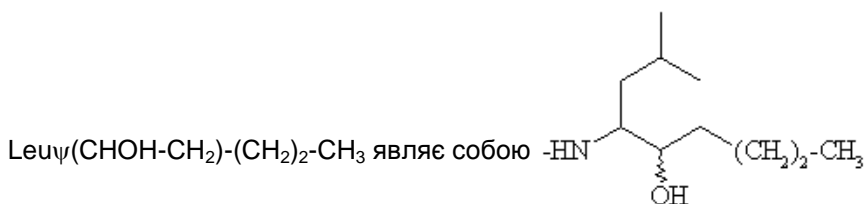
Хаа₃ являє собою статин, аналоги й ізомери статину, 4-Am,5-MeHрА, 4-Am,5-MeHxA або α-заміщені амінокислоти,

Хаа₄ являє собою Leu, Cpa, Cba, CpnA, Cha, t-buGly, tBuAla, Met, Nle, або ізо-Bu-Gly, і

20 Z являє собою NH або O;

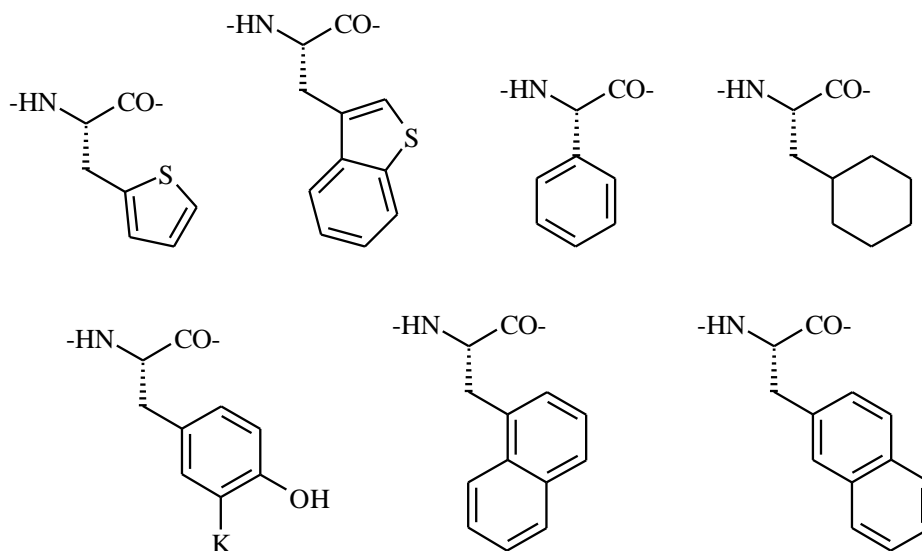
C-2: Хаа₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Хаа₂¹¹-His¹²-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃,

де

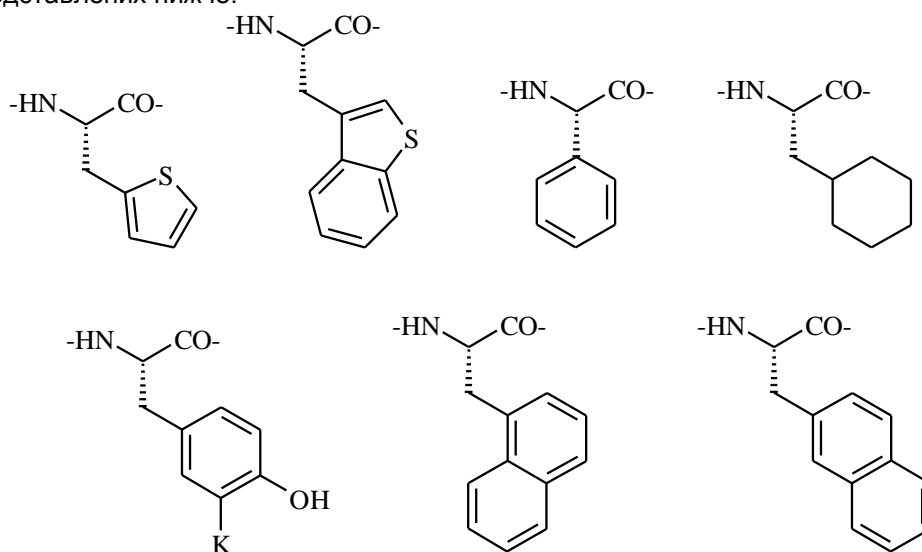


Хаа₁ являє собою D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp або залишок, що має будь-яку з формул, представлених нижче:

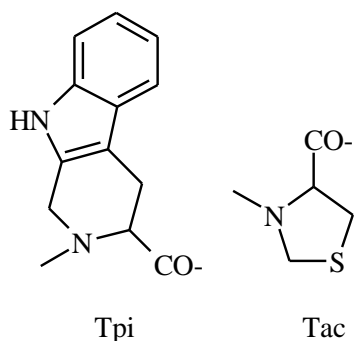
25



- і
 К являє собою F, Cl, I, або NO₂,
 Хаа₂ являє собою Gly або β-Ala;
 5 С-3: Хаа₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Хаа₂¹¹-His¹²-Хаа₅¹³-Хаа₆¹⁴-ZH,
 де
 Хаа₁ являє собою D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp або залишок, що має будь-яку з формул,
 представлених нижче:



- 10 К являє собою F, Cl, I, або NO₂,
 Хаа₂ являє собою Gly або β-Ala,
 Хаа₅ являє собою Leuψ-CH₂NH-,
 Хаа₆ являє собою Cys, Phe, Trp, Трі або Тас,
 де Трі і Тас мають наступні значення:

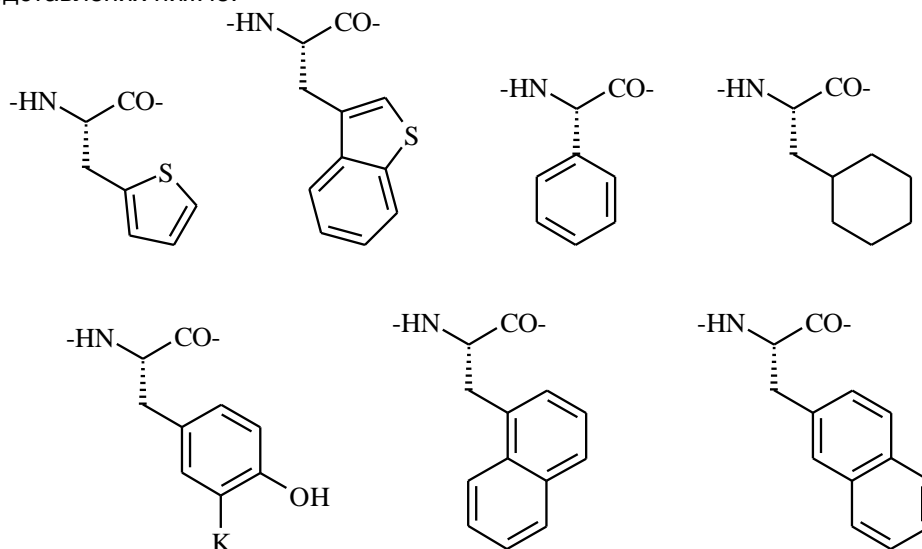


15

і

Z являє собою NH, або O;
 C-4: Xaa⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa¹¹-His¹²-Xaa⁷,
 де

5 Xaa₁ являє собою D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp або залишок, що має будь-яку з формул, представлених нижче:



K являє собою F, Cl, I, або NO₂,
 Xaa₂ являє собою Gly або β-Ala,
 Xaa₇ являє собою Leu-O-Алкіл, або Leu-NH-алкіл.

10 Визначення

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули, термін “алкіл”, сам або як частина іншої групи, стосується прямоланцюгової або розгалуженої алкільної групи з 1 - 20 атомами вуглецю, такої як, наприклад, метил, етил, пропіл, ізо-пропіл, бутіл, ізо-бутіл, трет-бутіл, пентил, ізо-пентил, нео-пентил, гептил, гексил, децил. Алкільні групи також можуть
 15 бути заміщені, наприклад, атомами галогену, гідроксильними групами, C₁-C₄-алкокси групами або C₆-C₁₂-арильними групами. Більш переважно алкіл являє собою C₁-C₁₀-алкіл, C₁-C₆-алкіл або C₁-C₄-алкіл.

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули, термін “нижчий нерозгалужений або розгалужений алкіл(ен)” будуть мати наступні значення: заміщений або
 20 незаміщений, нерозгалужений або розгалужений одновалентний, двовалентний або тривалентний радикал, що складається з вуглеців і воднів, який не містить ненасиченості і який має від одного до восьми атомів вуглецю, наприклад, включаючи, але не обмежуючись тільки ними, метил, етил, н-пропіл, н-пентил, 1,1-диметилетил (трет-бутіл), н-гептил і інші. Цей фрагмент може бути незаміщений або заміщений, наприклад, атомами галогену,
 25 гідроксильними атомами, C₁-C₄-алкокси групами або C₆-C₁₂-арильними групами.

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули, термін “феніленова” група ґрунтується на дво- або необов'язково три-заміщеному бензольному кільці. Наприклад, полі(п-фенілен) представляє собою полімер, побудований з пара-феніленових повторюваних одиниць. Фенілен може бути заміщеним або незаміщеним. Він може бути
 30 заміщений галогеном, OH, алкокси, переважно C₁-C₄-алкокси, карбокси, складним ефіром, переважно C₁-C₄-складним ефіром, амідом, нітро.

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули, термін “алкен” буде мати наступні значення: ненасичена аліфатична або аліциклічна хімічна сполука, що містить принаймні один вуглець-вуглецевий подвійний зв'язок. Найпростіші аліциклічні алкени,
 35 тільки з одним подвійним зв'язком і без інших функціональних груп, утворюють C_nH_{2n}, наприклад, етилен (C₂H₄), пропілен (C₃H₆). Алкени можуть бути заміщені або незаміщені. Якщо алкен заміщений, то вони можуть бути заміщені атомами галогену, гідроксильними групами, C₁-C₄-алкокси групами, C₆-C₁₂-арильними групами або ін.

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули, термін “арил” буде позначати ненасичену кільцеву систему, переважно ароматичну кільцеву систему, що більш переважно містить 6 - 12 атомів вуглецю в кільцевому скелеті. Їхніми прикладами є феніл і нафталеніл. Арильні фрагменти можуть бути незаміщені або заміщені, наприклад, атомами
 40 галогену, гідроксильними групами, C₁-C₄-алкокси групами або C₆-C₁₂-арильними групами.

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули, термін "бензол" буде мати наступні значення: органічна хімічна сполука з формулою C_6H_6 . Бензол являє собою ароматичний вуглеводень і другий [н]-анулен([6]-анулен), циклічний вуглеводень із безперервним рі зв'язком. Бензол може бути незаміщений або заміщений, наприклад, атомами

галогену, гідроксильними групами, C_1 - C_4 -алкокси групами або C_6 - C_{12} -арильними групами.

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули, терміни "алкеніл" і "алкініл" аналогічним чином визначаються як алкіл, але містять принаймні один вуглець-вуглецевий подвійний або потрійний зв'язок, відповідно. Алкеніл більш переважно може представляє собою C_2 - C_6 -алкеніл і алкініл більш переважно може представляє собою C_2 - C_6 -алкініл.

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули, термін "галоген" буде позначати F, Cl, Br або I.

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули, терміни "солі неорганічних або органічних кислот", "неорганічна кислота" і "органічна кислота" стосується мінеральних кислот, включаючи, але не обмежуючись тільки ними, такі кислоти, як: вугільна, азотна, фосфорна, соляна, перхлорна або сірчана кислота або їх кислі солі, такі як солі калію, натрію, кальцію, магнію, наприклад, гідросульфат калію, або підходящих органічних кислот, які включають, але не обмежуючись тільки ними: кислоти, такі як аліфатичні, циклоаліфатичні, ароматичні, араліфатичні, гетероциклічні, карбонові й сульфонові кислоти, прикладами яких є мурашина, оцтова, трифтороцтова, пропіонова, янтарна, гліколева, глюконова, молочна, яблучна, фумарова, піровиноградна, бензойна, антранілова, мезилова, фумарова, саліцилова, фенілоцтова, мигдалева, ембонова, метансульфонова, етансульфонова, бензолсульфонова, пантотенова, толуолсульфонова, трифторметансульфонова й сульфанілова кислота, відповідно. Аналогічно до цього, органічні кислоти також можуть бути представлені у вигляді із солей, таких як солі калію, натрію, кальцію, магнію.

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули, термін "фармацевтично прийнятна сіль" стосується солей неорганічних і органічних кислот, таких як мінеральні кислоти, включаючи, але не обмежуючись тільки ними, такі кислоти як вугільна, азотна або сірчана кислота, або органічні кислоти, включаючи, але не обмежуючись тільки ними, такі кислоти, як аліфатичні, циклоаліфатичні, ароматичні, араліфатичні, гетероциклічні, карбонові й сульфонові кислоти, прикладами яких є мурашина, оцтова, трифтороцтова, пропіонова, янтарна, гліколева, глюконова, молочна, яблучна, фумарова, піровиноградна, бензойна, антранілова, мезилова, саліцилова, фенілоцтова, мигдалева, ембонова, метансульфонова, етансульфонова, бензолсульфонова, пантотенова, толуолсульфонова й сульфанілова кислота.

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули, термін "проліки" означає будь-яку ковалентно зв'язану сполуку, яка вивільняє активний вихідний фармацевтичний засіб відповідно до формули (I).

Термін "проліки", як використовується в даній заявці, також охоплює фармацевтично прийнятні похідні, такі як складні ефіри, аміді й фосфати, таким чином, що в результаті біоперетворення в умовах *in vivo* продукт похідного являє собою активний лікарський засіб, як визначено у формулі (I). У джерелі Goodman і Gilman (The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8-а ред., McGraw-Hill, міжн. вид. 1992, "Biotransformation of Drugs", 13-15) описані проліки, розкриття цього джерела включене в дану заявку як посилання. Проліки сполуки згідно із даним винаходом одержують шляхом модифікації функціональних груп, які присутні у сполуці, таким чином, що модифікації відщеплюються, або при загальноприйнятій обробці або *in vivo*, у вихідну сполуку. Проліки сполук згідно із даним винаходом включають ті сполуки, у яких, наприклад, гідрокси група, така як гідрокси група на асиметричному атомі вуглецю, або аміногрупа зв'язана з будь-якою групою так, що при введенні проліків пацієнтові, вона відщеплюється з утворенням вільного гідроксилу або вільного аміно, відповідно.

Типові приклади проліків описані, наприклад, в WO 99/33795 A, WO 99/33815 A, WO 99/33793 A і WO 99/33792 A, розкриття яких повністю включене в дану заявку як посилання.

Проліки характеризуються дуже гарною розчинністю у воді, підвищеною біодоступністю й легко метаболізуються в активні інгібітори в умовах *in vivo*.

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули, терміни "амінокислотна послідовність" і "пептид" визначаються в даній заявці як поліамід, одержуваний шляхом (полі)конденсації принаймні двох амінокислот.

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули, термін "амінокислота" означає будь-яку молекулу, що містить принаймні одну аміногрупу й принаймні одну карбоксильну групу, але не містить пептидного зв'язку у молекулі. Інакше кажучи,

амінокислота являє собою молекулу, яка має функціональну групу карбонової кислоти й амінний азот, що має принаймні один вільний водень, переважно в альфа-положенні відносно нього, але не містить амідного зв'язку в молекулярній структурі. Таким чином, дипептид, що має вільну аміногрупу на N-кінці й вільну карбоксильну групу на C-кінці, не може розглядатися як

5 одинична "амінокислота" згідно з вищенаведеним визначенням. Амідний зв'язок між двома суміжними амінокислотними залишками, який одержують при такій конденсації, визначається як "пептидний зв'язок".

Амідний зв'язок, як використовується в даній заявці, означає будь-який ковалентний зв'язок, що має структуру



де карбонільна група забезпечується однією молекулою, а NH-група забезпечується іншою молекулою, які з'єднуються разом. Амідний зв'язок між двома суміжними амінокислотними залишками, який одержують при такій поліконденсації, визначається як "пептидний зв'язок". Необов'язково, атоми азоту поліамідного скелету (позначається як NH вище) незалежно можуть

15 бути алкіловані, наприклад, за допомогою $-C_1-C_6$ -алкілу, переважно за допомогою $-CH_3$.

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули, амінокислотний залишок має походження з відповідної амінокислоти шляхом утворення пептидного зв'язку з іншою амінокислотою.

Як використовується надалі у описі даного винаходу й у пунктах формули, амінокислота являти собою амінокислоту, яка зустрічається в природі, або амінокислоту, яка не зустрічається в природі, де амінокислота, яка не зустрічається в природі, представляє собою синтетичний / штучний амінокислотний залишок, протеїногенний та/або не-протеїногенний амінокислотний залишок. Не-протеїногенні амінокислотні залишки надалі можуть класифікуватися як (а) гомо аналог

20 протоїногенних амінокислот, (b) β -гомо аналог протоїногенних амінокислотних залишків і (c) подальші не-протеїногенні амінокислотні залишки.

Таким чином, амінокислотні залишки мають походження з відповідних амінокислот, наприклад, з

протоїногенні амінокислоти, а саме Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr і Val; або

не- протеїногенні амінокислоти, такі як гомо аналог протоїногенних амінокислот, де боковий ланцюг подовжений за допомогою метиленової групи, наприклад, гомоаланін (Hal), гомоаргінін (Har), гомоцистеїн (Hcy), гомоглутамін (Hgl), гомогістидин (Hhi), гомоізолейцин (Hil), гомолейцин (Hle), гомолізін (Hly), гомометіонін (Hme), гомофенілаланін (Hph), гомопролін (Hpr), гомосерин (Hse), гомотреонін (Hth), гомотриптофан (Htr), гомотирозин (Hty) і гомовалін (Hva);

30 β -гомоаналог протоїногенних амінокислот, де метиленова група вставлена між α -вуглицем і карбоксильною групою, приводячи до утворення β -амінокислот, наприклад, β -гомоаланін (β Hal), β -гомоаргінін (β Har), β -гомоаспарагін (β Has), β -гомоцистеїн (β Hcy), β -гомоглутамін (β Hgl), β -гомогістидин (β Hhi), β -гомоізолейцин (β Hil), β -гомолейцин (β Hle), β -гомолізін (β Hly), β -гомометіонін (β Hme), β -гомофенілаланін (β Hph), β -гомопролін (β Hpr), β -гомосерин (β Hse), β -гомотреонін (β Hth), β -гомотриптофан (β Htr), β -гомотирозин (β Hty) і β -гомовалін (β Hva);

подальші не-протеїногенні амінокислоти, наприклад, α -аміноадипінова кислота (Aad), β -аміноадипінова кислота (β Aad), α -аміномасляна кислота (Abu), α -аміноізомасляна кислота (Aib), β аланін (β Ala), 4-аміномасляна кислота (4-Abu), 5-аміновалеріанова кислота (5-Ava), 6-амінокапронова кислота (6-Ahx), 8-амінооктанова кислота (8-Aoc), 9-амінононанова кислота (9-Anc), 10-амінокапринова кислота (10-Adc), 12-амінолауринова кислота (12-Ado), α -аміносуберінова кислота (Asu), азетидин-2-карбонова кислота (Aze), β -циклогексилаланін (Cha), цитрулін (Cit), дегідроаланін (Dha), γ -карбоксиглутамінова кислота (Gla), α -циклогексилгліцин (Chg), пропаргілгліцин (Pra), піроглутамінова кислота (Glp), α -трет-бутилгліцин (Tle), 4-бензоілфенілаланін (Bra), δ -гідроксизин (Hyl), 4-гідроксипролін (Hyp), ало-

40 ізолейцин (alle), лантіонін (Lan), (1-нафтил)аланін (1-Nal), (2-нафтил)аланін (2-Nal), норлейцин (Nle), норвалін (Nva), орнітин (Orn), фенілгліцин (Phg), піпекілінова кислота (Pip), саркозин (Sar), селеноцистеїн (Sec), статин (Sta), β -тієнілаланін (Thi), 1,2,3,4-тетрагідроізохінолін-3-карбонова кислота (Tic), ало-треонін (α Thr), тiazолідин-4-карбонова кислота (Thz), γ -аміномасляна кислота (GABA), ізо-цистеїн (ізо-Cys), діамінопропіонова кислота (Dpr), 2,4-діаміномасляна кислота (Dab), 3,4-діаміномасляна кислота ($\gamma\beta$ Dab), біфенілаланін (Bip), фенілаланін, заміщений в пара-положенні за допомогою $-C_1-C_6$ -алкілу,

- галогеніду, $-NH_2$, $-CO_2H$ або Phe(4-R) (де R = $-C_1-C_6$ -алкіл, -галогенід, $-NH_2$, або $-CO_2H$); пептидні нуклеїнові кислоти (PNA, порівн., P.E. Nielsen, Acc. Chem. Res., 32, 624-30); або їх N-алкіловані аналоги, такі як їх N-метиловані аналоги.

55

Циклічні амінокислоти можуть бути протеїногенними або не-протеїногенними, такі як Pro, Aze, Glp, Hyp, Pip, Tic і Thz.

Для подальших прикладів і подробиць можна навести посилання, наприклад, J.H. Jones, J. Peptide Sci., 2003, 9, 1-8, розкриття якого повністю включене в дану заявку як посилання.

5 Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули, терміни "не-протеїногенна амінокислота" і "не-протеїногенний амінокислотний залишок" також охоплює похідні протеїногенних амінокислот. Наприклад, боковий ланцюг протеїногенного амінокислотного залишку може бути дериватизований, у такий спосіб перетворюючи протеїногенний амінокислотний залишок в "не-протеїногенний". Аналогічне застосовується й
10 для похідних C-кінця та/або N-кінця протеїногенного амінокислотного залишку, які знаходяться на кінцях амінокислотної послідовності.

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули, протеїногенний амінокислотний залишок має походження із протеїногенної амінокислоти, вибраної із групи, яка включає Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr і
15 Val або в L- або D-конфігурації; другий хіральний центр в Thr і Ile може мати або R- або S-конфігурації. Таким чином, наприклад, будь-яка посттрансляційна модифікація амінокислотної послідовності, така як N-алкілювання, яка може відбуватися в природі, надає відповідному модифікованому амінокислотному залишку "непротеїногенність", хоча в природі вказаний амінокислотний залишок включений у білок. Переважно модифіковані амінокислоти вибирають
20 із N-алкілованих амінокислот, β-амінокислот, γ-амінокислот, лантіонінів, дегідро амінокислот, і амінокислот з алкілованими гуанідиновими фрагментами.

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули, термін "карбонова кислота" або "дикарбонова кислота" означає органічні сполуки, що мають один COOH фрагмент або два COOH фрагменти, відповідно, такі як, наприклад, мурашина кислота,
25 оцтова кислота, пропіонова кислота, масляна кислота, циклогексан карбонова кислота, бензойна кислота, саліцилова кислота, молочна кислота (карбонові кислоти) або щавлева кислота, малінова кислота, янтарна кислота, адипінова кислота, фумарова кислота, малеїнова кислота, яблучна кислота, фталева кислота (дикарбонові кислоти), відповідно.

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули, термін "діамін" означає органічні сполуки, що мають два NR'R" фрагменти, де R' і R" незалежно один від одного можуть представляє собою алкіл, алкеніл, алкініл, арил. Діаміни можуть являти собою,
30 наприклад, етилендіамін, 1, 4-циклогексан діамін, піперазин.

Що стосується визначених у даному винаході вище амінокислот, карбонових кислот, дикарбонових кислот або діамінів, на які наводяться посилання, вони також специфічно включають відповідні радикали, отримані з таких амінокислот, карбонових кислот, дикарбонових
35 кислот або діамінів, відповідно, і це охоплюється сполуками згідно з винаходом, тобто, -HN-...-CO- (амінокислота), -OC-... (карбонова кислота),

-OC-...-CO- (дикарбонова кислота), -HN-...-NH- (діамін), наприклад.

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули, термін "хелатор металу" визначається як молекула, яка утворює комплекс із радіонуклідним металом з
40 одержанням комплексу металу, який стабільний у фізіологічних умовах і який також може бути кон'югований із цільовою групою за допомогою спейсеру. Хелатор металу утворює комплекс або не утворює комплекс із радіонуклідним металом.

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули; формулювання
45 "радіонуклідний метал" визначається як радіонуклід, який являє собою атом з нестабільним ядром, де ядро характеризується надлишковою енергією, яка доступна для передачі або до знову створеної радіоактивної частинки в межах ядра, або ще до атомного електрона (див. внутрішнє перетворення). Радіонуклідні метали, використовувані в даній заявці, особливо придатні для діагностичного або терапевтичного застосування, більш переважно для
50 візуалізації або променевої терапії. Радіонуклід, у цьому процесі, зазнає радіоактивного розпаду, і емітують (а) гамма-промені та/або елементарні частинки. Ці частинки становлять іонізуюче випромінювання. Радіонукліди можуть зустрічатися в природі, а також можуть бути отримані штучно.

Ці радіонуклідні метали включають, але не обмежуючись тільки ними, галій (наприклад, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga) мідь (наприклад, ⁶⁷Cu і ⁶⁴Cu); технецій (наприклад, ^{99m}Tc і ^{94m}Tc); реній (наприклад, ¹⁸⁶Re і ¹⁸⁸Re); свинець (наприклад, ²¹²Pb); вісмут (наприклад, ²¹²Bi); і паладій (наприклад, ¹⁰⁹Pd).
55 Способи одержання цих ізотопів відомі. Комерційно доступні генератори молібден/технецій для одержання ^{99m}Tc. Процедури для одержання ¹⁸⁶Re включають процедури, описані Deutsch та ін., (Nucl. Med. Biol., том 13:4:465-477, 1986) і Vanderheyden та ін. (Inorganic Chemistry, том 24:1666-1673, 1985), і способи одержання ¹⁸⁸Re описані Blachot та ін. (Intl. J. of Applied Radiation and
60

Isotopes, том 20:467-470, 1969) і Klofutar та ін. (J. of Radioanalytical Chem, том 5:3-10, 1970). Одержання ^{212}Pb описане в Fawwaz та ін., J. Nucl. Med, (1984), 25:796. Одержання ^{212}Pb і ^{21}Bi описане в Gansow та ін., Amer. Chem. Soc. Symp. Ser. (1984), 241:215-217, і Kozah та ін., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, (January 1986), 83:474-478. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ є переважним для діагностичного

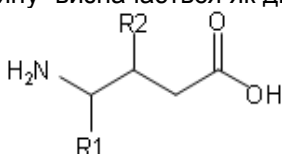
застосування, і інші радіонукліди, перераховані вище, мають терапевтичне застосування.

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули, термін "спейсер" визначається як зв'язувальна група між хелатором металу й антагоністами пептиду бомбезину.

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули; формулювання "агоніст" означає речовину (ліганд), який зв'язується зі специфічним сайтом на рецепторній молекулі клітини й у такий спосіб активує передачу сигналів у клітці. Це приводить до вимірюваного ефекту.

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули; формулювання "антагоніст" означає речовину (ліганд), яка зв'язується із сайтом на рецепторній молекулі, який специфічний для речовини-агоніста, блокуючи в такий спосіб цей сайт для агоніста, без здійснення ефекту. Таким чином, антагоніст інгібує дію агоніста.

Як використовується надалі в описі даного винаходу й у пунктах формули, термін "аналог статину" визначається як ди-пептидний міметик з наступною загальною структурою



Статин R2 = OH, R1 може значно змінюватися, але звичайно вони мають такі ж значення, що й бокові ланцюги амінокислот

Аналоги статину R2 = H, R1 може значно змінюватися, але звичайно вони мають такі ж значення, що й бокові ланцюги амінокислот

Скорочення:

NODASA = 1,4,7-ТРИАЗАЦИКЛОНОНАН-1-ЯНТАРНА КИСЛОТА-4,7-АЦЕТООЦТОВА КИСЛОТА

NODAGA = 1,4,7-триазациклононан-N-глутарова кислота-N',N''-ацетООЦТОВА кислота

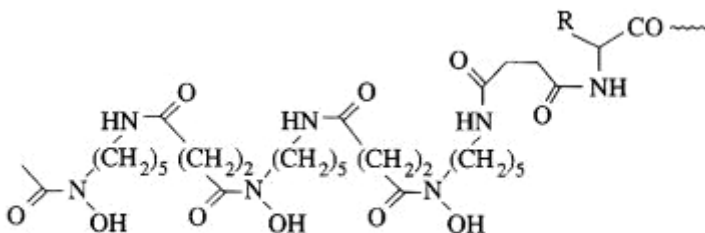
TRITA = 1,4,7,10 тетраазациклотридекан-1,4,7,10 N, N', N'', N'''-тетраОЦТОВА кислота

Сра = (S)-4-карбоксамідофенілаланін

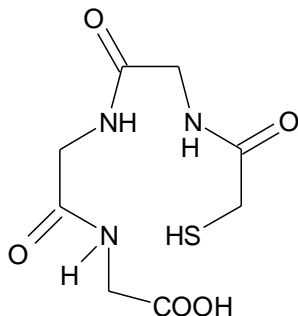
4-Am-5-MeHpA = 4-аміно-5-метилгептанова кислота

4-Am-5-MeHxA = 4-аміно-5-метилкапронова кислота

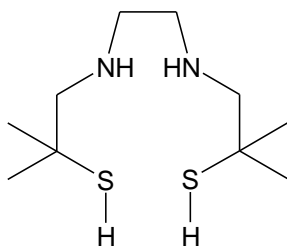
DFO = N'-[5-(ацетил-гідрокси-аміно)пентил]-N-[5-[3-(5-амінопентил-гідрокси-карбамоїл)пропаноліаміно]пентил]-N-гідрокси-бутандіамід



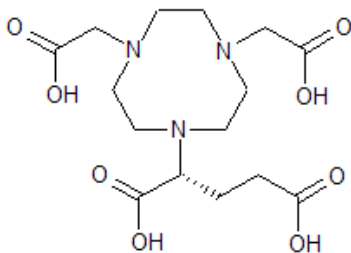
DFO



триамід монотіол (MAG3)



бісамін біс тіол (BAT)



NODAGA

Без додаткових досліджень, припускають, що фахівець у даній галузі техніки може, застосовуючи попередній опис, використовувати даній винахід у його найбільш повному обсязі. Таким чином, наступні переважні специфічні варіанти здійснення інтерпретуються винятково як ілюстративні, і жодним чином не обмежують дане розкриття.

Фігури

Фігура 1: Криві залежності «доза-ефект» аналогів бомбезину, визначені за допомогою аналізу вивільнення кальцію.

Аналіз вивільнення кальцію здійснювали, як описано в матеріалах і методах. PC3 клітини обробляли або бомбезином при концентраціях у діапазоні від 0,01 нмоль/л до 10 мкмоль/л (●) окремо, або в присутності 10 мкмоль/л аналогів бомбезину Сполука 1 (▲), або In- Сполука 1 (◆), або аналогів бомбезину Сполука 1а (■). Сполука 1, тестували окремо при концентрації 1 мкмоль/л і 10 мкмоль/л Сполука 1 (△), In- Сполука 1 (×) і сполука 1а (□) не має дії на вивільнення кальцію в PC3 клітинах. Сполука 1а стосується зв'язувальної послідовності 1, без лінкеру й хелату (D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂). Сполука 1 стосується хелату (D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂). In-сполука 1 стосується In-хелатованого (D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂).

Фігура 2: Імунофлуоресцентна мікроскопія HEK-GRPR клітин

Імунофлуоресцентна мікроскопія при введенні Сполуки 1, In-Сполуки 1, Сполуки 1b і GRPR-АНТАГ, використовуючи мишине моноклональне антитіло з НА-епітопом і HEK-GRPR клітинами. (a) без пептиду, (b) 10 нмоль/л бомбезину, (c) Сполука 1b, (d) Сполука 1b + 10 нмоль/л бомбезину, (d, f, h, j) клітини, оброблені 10 нмоль/л бомбезину в присутності 1 мкмоль/л аналогів Сполука 1b, GRPR-АНТАГ, Сполука 1, і In-Сполука 1, (c, e, g, i) клітини, оброблені Сполукою 1b, GRPR-АНТАГ, і Сполукою 1.

Фігура 3a, 3b, 4a, 4b: PET-Візуалізація в мишей, що несуть пухлину PC-3 (3) і LNCaP (4) для Ga-68-DOTA Сполуки 2. a) 1 година після ін'єкції 10 МБк радіоактивного індикатора, b) блоковано за допомогою 100 мкг бомбезину.

Фігура 6: SPECT/CT (однофотонна емісійна комп'ютерна томографія/ комп'ютерна томографія) зображення ^{99m}Tc-ARN4-06 (15 МБк/200 пмоль) у мишей, що несуть PC-3-пухлину

Фігура 8: SPECT/CT зображення ^{99m}Tc-ARN4-05 (15 МБк/200 пмоль) у мишей, що несуть PC-3-пухлину.

Фігура 9: ВЕРХ аналіз Ga-68-DOTA Сполуки 2 на колонці із оберненою фазою.

Фігура 10a, b, c, d, e: Дослідження стабільності Ga-68-DOTA Сполуки 2 у плазмі й сечі мишей, при аналізі за допомогою ВЕРХ.

Фігура 11: Стабільність у сироватці людини Lu-177-DOTA Сполуки 2.

Фігура 12: Порівняння пухлина /тканина Ga-68 RM2 з F18 FDG і F18 холіном

Повне (і) розкриття усіх заявок, патентів і публікацій, процитованих у даній заявці, повністю включені в даний винахід як посилання.

Наступні приклади можуть бути повторені з подібним успіхом при заміні реагентів та/або умов здійснення, описаних у загальному або специфічно в даній заявці, на ті, які використовуються у вищепредставлених прикладах.

З вищенаведеного опису, фахівець у даній галузі техніки може встановити суттєві характеристики даного винаходу й, без відхилення від суті й обсягу винаходу, може здійснити різні зміни й модифікації для адаптації до різних використань і умов.

Приклади

де А має значення А, а також А', у відповідних випадках, для всіх прикладів, описаних далі.

Приклад 1 (А-В-С)

де А має значення А, а також А', у відповідних випадках, для всіх прикладів, описаних далі.

а) Синтез кон'югатів антагоніста пептиду бомбезину із загальною послідовністю

(А = DOTA, В = Спейсер В₁ – В₂, С = Пептид з N-кінцевим амідом Z [Z = NH])

DOTA-Спейсер-Хаа₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Хаа₂¹¹-His¹²-Sta¹³-Leu¹⁴-NH₂

Пептиди синтезували вручну на твердій фазі, використовуючи Fmoc-Стратегію. Для одержання N-кінцевих амідів, використовували Rink амід MBHA полімер LL (100-200 меш) (4-(2',4'-Диметоксифеніл-Fmoc-амінометил)-феноксіацетамід-норлейцил-4-Метилбензгідриламін полімер. У цілому, Rink амід MBHA полімер з теоретичним завантаженням 0,34 ммоль/г полімеру вводили в реактор. У реактор додавали N, N-Диметилформамід (ДМФА) і струшували протягом 30 хвилин для можливості набрякання полімеру. Після видалення розчинника, додавали розчин 20 % піперидину в ДМФА й полімер струшували протягом 15 хвилин для видалення 9-флуоренілметоксикарбонільної (Fmoc) захисної групи. Цю стадію повторювали двічі. Після здійснення цієї процедури, полімер промивали три рази протягом 5 хвилин із ДМФА. Піперидиновий розчин і ДМФА розчин з останніх трьох промивань збирали й наповнювали етанолом до 100 мл. Із цього розчину відбирали аліквоти для визначення кількості вилучених Fmoc-захисних груп спектрофотометрично.

Перед комбінацією Fmoc-амінокислотний дериватизований полімер промивали два рази протягом 2 хвилин із ДМФА. 2 еквіваленти Fmoc-амінокислот, попередньо активованих з 2 еквівалентами N, N-Діізопропілкарбодіміду (DIC) / N-Гідроксибензотриазолу (HOBt), додавали до полімеру й значення pH доводили до 8-9 шляхом додавання близько 4 еквівалентів N-Етилдіізопропіламіну (DIPEA). Реакцію інкубували протягом 2 годин при обережному струшуванні. Після реакції, розчин видаляли й тверду фазу два рази промивали протягом 5 хвилин із ДМФА. За здійсненням реакції спостерігали за допомогою тесту Kaiser. Певну кількість кульок полімеру промивали 3 рази етанолом, 50 мкл розчину 1 (20 г фенолу в 10 мл етанолу змішували з 1 мл розчину 0,01 М KCN в 49 мл піридину) і 50 мкл розчину 2 (500 г нінгідрину в 10 мл етанолу) додавали й кульки нагрівали протягом 10 хвилин при 95 °C. Сині кульки вказували на незв'язані функціональні аміногрупи.

Усі амінокислоти використовували у вигляді N-кінцевих Fmoc-захисених похідних і їх об'єднували аналогічним способом. Триптофан використовували із трет-бутилоксикарбонільною (Boc) захисною групою на боковому ланцюзі, тоді як гістидин і глютамін були Trt захищені. Якщо Kaiser тест здійснювали після зв'язування кожної з амінокислот, і він вказував на неповне зв'язування функціональних аміногруп, зв'язування повторювали.

Після створення повної бажаної пептидної послідовності, полімер промивали 5 разів із ДХМ, після цього 5 разів промивали простим діетиловим ефіром, кожного разу протягом 2 хвилин і висушували у вакуумі.

b) Зв'язуванням зі СПЕЙСЕРом і прохелатором DOTA(^tBu)₃

Прохелатор DOTA(^tBu)₃ одержували від Macrocyclics Inc., Dallas, USA. Перед зв'язуванням зі СПЕЙСЕРом, N-кінцевий Fmoc-захист видаляли з пептидів, зв'язаних з полімером. Полімер набухав протягом 15 хвилин у ДМФА, його два рази обробляли розчином 20 % піперидину в ДМФА (15 хвилин) і промивали три рази за допомогою ДМФА. Розчин з піперидинових обробок і наступні ДМФА промивання збирали для визначення кількості відщеплених Fmoc груп.

2 еквіваленти Спейсеру, попередньо активованого з гексафторфосфатом 2-(1H-9-Азабензотриазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраметил-амінію (HATU) протягом 20 хвилин у ДМФА, додавали до полімеру. Значення pH доводили до 8-9 шляхом додавання DIPEA. Реакційну суміш струшували протягом 2 години й за зв'язуванням спостерігали за допомогою тесту Kaiser. Прохелатор DOTA(^tBu)₃ зв'язували аналогічним способом після видалення Fmoc, як було описано раніше. DOTA(^tBu)₃ зв'язування струшували протягом ночі. Після видалення розчину, полімер промивали 3 рази ДМФА, 5 раз ДХМ, після цього 5 раз промивали простим діетиловим ефіром, кожного разу протягом 2 хвилин і висушували у вакуумі.

c) Зняття захисту, відщеплення й очищення

Пептид-Полімер відбирали в шприц, обладнаний фритою. Додавали розчин трифтороцтової кислоти (ТФО)/тіоанізолу (ТА)/триізопропілсилану (TIS)/H₂O (94/2/2/1) і шприц збовтували протягом 2 годин. Розчин додавали до суміші 50 % діізопропілового ефіру й 50 % діетилового ефіру на льоді, надаючи можливість осадитися пептиду. Пептид збирали шляхом центрифугування при 3000 об./хв. протягом 5 хвилин і супернатант відкидали. Осад декілька разів промивали діетиловим ефіром і висушували у вакуумі. Неочищений продукт розчиняли у воді й очищали шляхом напівпрепаративної ВЕРХ із оберненою фазою на системі Metrohm ВЕРХ LC-CaDI 22-14 (Herisau, Switzerland) із колонкою Macherey-Nagel VP 250/21 Nucleosil 100-5 C₁₈ (елюенти: елюент 1 = 0,1 % ТФО у воді й елюент 2 = ацетонітрил; градієнт: 0-20 хв., 90 % - 50 % елюент 1; потік: 15 мл/хв.).

Кон'югати аналізували шляхом аналітичної ВЕРХ із оберненою фазою й характеризували шляхом мас-спектроскопії (ESI-MS).

A-B-C-1

DOTA-Спейсер-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₃¹³-Xaa₄¹⁴-ZH (Z = NH)

Сполука 1: A = DOTA, B₁ = Gly, B₂ = 4-амінобензоїл; Xaa₁ = DPhe; Xaa₂ = Gly; Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu,

DOTA-Gly-амінобензоїл-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₈₀H₁₁₄N₂₀O₂₀, розраховано (m/z): 1675,8, виявлено [M+K]⁺: 1715,1.

5 Сполука 2: A = DOTA, B₁ = 4-аміно-1-карбоксиметил-піперидиніл; B₂ = нема, Xaa₁ = DPhe; Xaa₂ = Gly; Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu

DOTA-4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₇₉H₁₁₈N₂₀O₁₉; розраховано (m/z): 1639,9, виявлено [M+K]⁺: 1678,1

10 Сполука 3: A = DOTA, B₁ = 4-аміно-1-піперидин-4-карбокси; B₂ = нема, Xaa₁ = DPhe; Xaa₂ = Gly; Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu

DOTA-4-аміно-1-піперидин-4-карбонова кислота-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₇₇H₁₁₆N₂₀O₁₉, розраховано (m/z): 1624,9, виявлено [M+K]⁺: 1663,7

Сполука 4: A = DOTA, B₁ = 15-аміно-4,7,10,13-тетраоксапентадеканоїл; B₂ = нема, Xaa₁ = DPhe; Xaa₂ = Gly; Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu

15 DOTA-15-аміно-4,7,10,13-тетраоксапентадеканова кислота-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₈₂H₁₂₇N₁₉O₂₃, розраховано (m/z): 1747,8, виявлено [M+K]⁺: 1785,1

Сполука 5: A = DOTA, B₁ = 15-аміно-4,7,10,13-тетраоксапентадеканоїл; B₂ = 4-аміно-1-піперидин-4-карбокси, Xaa₁ = DPhe; Xaa₂ = Gly; Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu

20 DOTA-(15-аміно-4,7,10,13-тетраоксапентадеканова кислота)-(4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин)-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₈₉H₁₃₉N₂₁O₂₄, розраховано (m/z): 1886,0, виявлено [M+K]⁺: 1924,9

Сполука 6: A = DOTA, B₁ = діаміномасляна кислота; B₂ = нема, Xaa₁ = DPhe; Xaa₂ = Gly; Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu

25 DOTA-діаміномасляна кислота-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₇₅H₁₁₄N₂₀O₁₉, розраховано (m/z): 1598,9, виявлено [M+K]⁺: 1638,4

Сполука 7: A = DOTA, B₁ = 4-(2-аміноетил)-1-карбоксиметил-піперазиніл; B₂ = нема, Xaa₁ = DPhe; Xaa₂ = Gly; Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu

DOTA-4-(2-аміноетил)-1-карбоксиметил-піперазин-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₇₉H₁₂₁N₂₁O₁₉, розраховано (m/z): 1667,9, виявлено [M+Na]⁺: 1691,2

30 Сполука 8: A = DOTA, B₁ = (5-аміно-3-окса-пентил)-напівамід янтарної кислоти; B₂ = нема, Xaa₁ = DPhe; Xaa₂ = Gly; Xaa₃ = Sta; Xaa₄ = Leu

DOTA-(5-аміно-3-окса-пентил)-напівамід янтарної кислоти-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

C₇₉H₁₂₀N₂₀O₂₁, розраховано (m/z): 1685,9, виявлено [M+K]⁺: 1723,7

35 Приклад 2 (A-B-C)

а) Синтез кон'югатів антагоніста пептиду бомбезину із загальною послідовністю

(A = N₄-азидо, B = Спейсер B₁ – B₂, C = пептид з N-кінцевим амідом Z [Z = NH₂])

N триазолі-dPEG₁-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Sta¹³-Leu¹⁴-NH₂

а) Синтез пептидів: Fmoc-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Sta¹³-Leu¹⁴-NH₂

40 Пептиди синтезували вручну на твердій фазі, використовуючи Fmoc-стратегію. Для одержання N-кінцевих амідів, використовували Rink амід MBHA полімер LL (100-200 меш). Синтез здійснювали, як описано в прикладі 1.

б) Сполучення з алкільною групою пропаргіл-dPEG1-NHS-складного ефіру

45 Перед комбінацією з алкільною групою, N-кінцевий Fmoc-захист видаляли з пептидів, зв'язаних з полімером. Полімер набухав протягом 15 хвилин у ДМФА, його два рази обробляли розчином 20 % піперидину в ДМФА (15 хвилин) і промивали три рази за допомогою ДМФА. Розчин з піперидинової обробки й наступні ДМФА промивання збирали для Fmoc визначення.

2 еквіваленти пропаргіл-dPEG₁-NHS-складного ефіру додавали до полімеру. Значення pH доводили до 8-9 шляхом додавання DIPEA. Реакційну суміш струшували протягом 24 години й за зв'язуванням спостерігали за допомогою тесту Kaiser.

50 с) Зняття захисту, відщеплення й очищення

Пептид-Полімер відбирали в шприц, обладнаний фритою. Додавали розчин ТФО/TIS/H₂O (94/2,5/2,5) і шприц збовтували протягом 2 годин. Розчин додавали до суміші 50 % діізопропілового ефіру й 50 % діетилового ефіру на льоді, надаючи можливість осадитися пептиду. Пептид збирали шляхом центрифугування при 3000 об./хв. протягом 5 хвилин і супернатант відкидали. Осад декілька разів промивали діетиловим ефіром і висушували у вакуумі. Неочищений продукт розчиняли у воді й очищали шляхом напівпрепаративної ВЕРХ із оберненою фазою, як описано вище.

60 Кон'югати аналізували шляхом аналітичної ВЕРХ із оберненою фазою й характеризували шляхом мас-спектроскопії (ESI-MS).

d) Синтез N_4 -азидо хелатору. У синтезі задіяно 3 стадії.

i) Синтез N,N',N'',N''' -тетракіс(трет-бутилоксикарбоніл)-6-(азидо)-1,4,8,11-тетраазаундекану ($N_4(Boc)_4-N_3$) [3]:

a) N,N',N'',N''' -тетракіс(трет-бутилоксикарбоніл)-6-(гідрокси)-1,4,8,11-тетраазаундекан ($N_4(Bob)_4.OH$) [1]: Розчин 6-(гідрокси)-1,4,8,11-тетраазаундекану (1 г, 3,1 ммоль) у ДМФА (10 мл) охолоджували до 0 °C. До нього додавали розчин ди-трет-бутилдикарбонату (3,32 мл, 15,5 ммоль) у ДМФА (5 мл), потім додавали DIPEA (2,7 мл, 15,5 ммоль). Після цього реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 18 годин. Після завершення цього часу реакції, реакційну суміш розподіляли між водою й етилацетатом. Водний шар екстрагували тричі за допомогою етилацетату й об'єднану етилацетатну фазу промивали розчином хлориду натрію й висушували над безводним сульфатом натрію. При здійсненні фільтрації й упарюванні розчинника при зниженому тиску одержували вказану в заголовку сполуку з виходом 86 %.

ii) N,N',N'',N''' -тетракіс(трет-бутилоксикарбоніл)-6-(О-метил сульфоніл)-1,4,8,11-тетраазаундекан ($N_4(Bob)_4-O-SO_2CH_3$) [2]:

До розчину 1 (300 мг, 0,54 ммоль) у піридині (3 мл) додавали метилсульфоніл хлорид (84 мкл, 1,08 ммоль). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі до її завершення, за чим спостерігали за допомогою ТШХ. Розчинник упарювали при зниженому тиску, залишок ресуспендували в етилацетаті. Етилацетат промивали три рази за допомогою 10 % $NaHCO_3$ і води й висушували над безводним сульфатом натрію. При здійсненні фільтрації й упарюванні розчинника при зниженому тиску одержували неочищений продукт, який додатково очищали шляхом колонкової хроматографії на силікагелі, одержуючи вказану в заголовку сполуку з виходом 84 %.

iii) N,N',N'',N''' -тетракіс(трет-бутилоксикарбоніл)-6-(азидо)-1,4,8,11-тетраазаундекан ($N_4(Boc)_4-N_3$) [3]:

Суспензію 2 (250 мг, 0,38 ммоль) і азиду натрію (100 мг, 1,52 ммоль) у ДМФА (3 мл) перемішували при 75 °C протягом 5 годин. Цю реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 18 годин. Потім реакційну суміш розподіляли між водою й етилацетатом. Водний шар екстрагували тричі за допомогою етилацетату й об'єднаний етилацетат промивали розчином хлориду натрію й висушували над безводним сульфатом натрію. При здійсненні фільтрації й упарюванні розчинника при зниженому тиску, одержуючи неочищений продукт, який потім очищали шляхом колонкової хроматографії. (вихід 88 %).

d) Сполучення в розчині

Пептид (6,2 мг, 5 мкм) з кінцевою алкільною групою й 3 (3 мг, 5 мкм) розчиняли в суміші 1:1 вода й трет-бутиловий спирт (1 мл). Додавали мідний порошок (10 мг), потім додавали 0,1 М водний пентагідрат сульфату міді (60 мкл, 6 мкм, 1,2 еквів.) і реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 24 годин. Мідний порошок відфільтровували, розчинник видаляли при зниженому тиску. Неочищений пептид очищали шляхом напівпрепаративної ВЕРХ із оберненою фазою.

Кон'югат хелатор-пептид обробляли за допомогою ТФО:ТІS:H₂O (95:2:3) протягом 2 годин. Розчинник видаляли при зниженому тиску. Неочищений продукт розтирали в порошок з діетиловим ефіром і очищали шляхом напівпрепаративної ВЕРХ із оберненою фазою, як описано вище.

Кон'югати аналізували шляхом аналітичної ВЕРХ із оберненою фазою й характеризували шляхом мас-спектроскопії (ESI-MS).

Сполука 14: A = N_4 -азидо, B₁ = пропаргіл-dPEG₁-NHS-складний ефір; B₂ = нема, Хаа₁ = DPhe; Хаа₂ = Gly; Хаа₃ = Sta; Хаа₄ = Leu

N_4 -триазиоли-dPEG₁-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂; C₆₈H₁₀₅N₂₁O₁₃, розраховано (m/z): 1424,7, виявлено [M+H]⁺: 1425,5

Приклад 3 (A-B-C2)

DOTA-Спейсер- Хаа₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Хаа₂¹¹-His¹²-Leuψ(CHOH)-(CH₂)₂-CH₃
Усі псевдопептиди синтезували в рідкій фазі шляхом конденсації гептапептиду Fmoc-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Хаа₂-His-OH з модифікованою амінокислотою H-Leuψ(CHOH)-(CH₂)₃-CH₃.

a) Синтез гептапептиду Fmoc-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Хаа₂-His-OH

Пептиди синтезували вручну на 2-хлортритил хлорид полімері, використовуючи Fmoc стратегію. У цілому, 2-хлортритил хлорид полімер з теоретичним завантаженням 1,4 ммоль/г полімеру вводили в реактор. Полімер набухав у ДХМ протягом 30 хвилин і першу амінокислоту зв'язували шляхом додавання 1 еквівалента амінокислоти, змішаної з 4-кратним молярним надлишком DIPEA у ДХМ. Суміш для реакції сполучення перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин і потім полімер два рази промивали сумішшю ДХМ/MeOH/DIPEA (17/2/1), два рази ДХМ і на завершення він набухав у ДМФА. Fmoc знімали захист,

використовуючи 20 % піперидин у ДМФА, і кількість вилученої Fmoc- захисної групи визначали спектрофотометрично при 300 нм. Наступну амінокислоту зв'язували шляхом додавання 2-кратного молярного надлишку амінокислоти, змішаної з еквімолярними кількостями DIC/HOBt, і 4-кратним молярним надлишком DIPEA у ДМФА. Полімер збовтували при кімнатній температурі протягом 2 годин і за здійсненням спостерігали за допомогою нінгідринового тесту Kaiser. Кожну амінокислоту зв'язували, використовуючи аналогічну стратегію.

b) Зв'язування зі СПЕЙСЕРом і прохелатором DOTA (^tBu)₃

Зв'язування здійснювали, як описано вище.

c) Відщеплення й очищення

Повністю захищені пептиди відщеплювали від твердої основи шляхом суспендування полімеру в суміші ТФО/TIS/ДХМ (1/5/94). Декілька разів відсмоктували аж до об'єму 5 мл відщепленого розчину за допомогою шприца, інкубували протягом 10 хвилин і відщеплені фракції збирали в колбу об'ємом 50 мл. Після збору всіх фракцій, у колбу додавали 3X10 мл толуолу, розчинники упарювали й згодом продукт висушували протягом 1 години при вакуумі з масляним насосом.

d) Синтез Boc-Leuψ(CHOH)-(CH₂)₃-CH₃. Синтез здійснювали в три стадії.

i) Синтез Boc-Leu-N(OCH₃)CH₃

Boc-Leu-OH (1 г, 4,3 ммоль) розчиняли в ДХМ (30 мл) і додавали тетрафторборат 2-(1H бензотриазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраметилуронію (TBTU)(1,380 г, 4,3 ммоль), HOBt (0,581 г, 4,3 ммоль) і DIPEA (743 мкл, 4,3 ммоль) при 0 °C. Після перемішування протягом 5 хвилин, додавали гідрохлорид O, N-Диметилгідроксиламіну (0,461 г, 4,73 ммоль) і DIPEA (817 мкл, 4,73 ммоль). Усі тверді речовини розчинялися протягом 10 хвилин і суміш перемішували протягом ночі при КТ. Розчинник упарювали, реакційну суміш повторно розчиняли в AcOEt і декілька разів промивали за допомогою H₂O, 5 % лимонної кислоти, H₂O, 5 % водного розчину NaHCO₃, насиченого розчину NaCl. Розчин висушували над MgSO₄ і розчинник видаляли у вакуумі. Бажану сполуку очищали шляхом колонкової хроматографії на силікагелі. ESI-MS: розр. 269; виявлено 292 [M +Na]⁺.

ii) Синтез Boc-Leu-(CH₂)₃-CH₃

Магній (0,330 г, 13,6 ммоль) активували шляхом суспендування в толуолі протягом 30 хвилин в атмосфері N₂. Толуол видаляли й Mg висушували в атмосфері N₂. До суспензії Mg у ТГФ (20 мл) додавали бромбутан (1,46 мл, 13,6 ммоль) по краплях і суміш нагрівали в колбі зі зворотним холодильником. Після розчинення всього магнію, по краплях додавали Boc-Leu-N(OCH₃)CH₃ у ТГФ і реакцію перемішували протягом 2 годин при 0 °C. Додавали 1M HCl (150 мл), потім додавали етилацетат (100 мл). Органічний шар промивали 1M гідросульфатом калію, водою, висушували (Na₂SO₄) і концентрували у вакуумі. Очікуваний продукт очищали шляхом колонкової хроматографії на силікагелі. Продукт характеризували шляхом ¹H-ЯМР і ¹³C-ЯМР. ESI-MS: розр. 271; виявлено 293,3 [M +Na]⁺.

iii) Синтез Boc-Leuψ(CHOH)-(CH₂)₃-CH₃

До розчину Boc-Leu-(CH₂)₃-CH₃ (0,190 г, 0,7 ммоль) у метанолі (5 мл) додавали NaBH₄ (0,104 г, 2,8 ммоль). Реакційну суміш додатково перемішували протягом 1 години, потім нейтралізували оцтовою кислотою й розчинник видаляли при зниженому тиску. Очікуваний продукт осаджували з насиченим бікарбонатним розчином. Пептид збирали шляхом фільтрації, промивали водою, гексаном і висушували. Продукт характеризували шляхом ¹H-ЯМР і ¹³C-ЯМР. ESI-MS: розр. 272; виявлено 273 [M +H]⁺; 547,7 [2M+H]⁺.

iv) Зв'язування в розчині

Boc-Leuψ(CHOH)-(CH₂)₃-CH₃ знімали захист, використовуючи розчин 80 % ТФО в ДХМ. Через 1 годину розчин концентрували, декілька разів промивали ДХМ і висушували.

Хелатор-Спейсер-Пептид розчиняли в ДМФА, додавали HATU (1,2 еквівалента) і суміш перемішували протягом 1 години. H-Leuψ(CHOH)-(CH₂)₃-CH₃ розчиняли в ДМФА й додавали до пептиду. Значення pH доводили до 8, використовуючи DIPEA, і реакцію перемішували протягом 4 годин при RT.

Розчинник концентрували й пептид, повністю захищений, одержували шляхом осадження з H₂O на льоді. Неочищений пептид осаджували, охолоджували, центрифугували й відокремлювали від розчинника шляхом декантування. Для одержання повністю незахищеного пептиду, його солюбілізували в суміші ДХМ/ТФО/TIS/H₂O 10/85/2,5/2,5. Через 4 години розчин концентрували й пептид осаджували, використовуючи суміш 50 % діетилового ефіру й 50 % діізопропілового ефіру на льоді. Після цього пептид збирали шляхом центрифугування при 3000 об./хв. протягом 5 хвилин і супернатант відкидали. Осад декілька разів промивали діетиловим ефіром і після цього неочищений продукт витримували у вакуумі протягом ночі для видалення

розчинників, що залишилися. Неочищений продукт розчиняли у воді й очищали шляхом препаративної, як описано раніше.

Кон'югати аналізували шляхом аналітичної ВЕРХ із оберненою фазою й характеризували шляхом мас-спектроскопії (ESI-MS).

5 Сполука 9: A = DOTA, B₁ = 4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин; B₂ = нема, Xaa₁ = DPhe; Xaa₂ = Gly;

DOTA-4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃, C₇₄H₁₁₂N₁₈O₁₇, розраховано (m/z): 1524,8, виявлено [M+K]⁺: 1564,3

10 Сполука 10: A = DOTA, B₁ = 15-аміно-4,7,10,13-тетраоксапентадеканоїл; B₂ = 4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин, Xaa₁ = DPhe; Xaa₂ = Gly;

DOTA-PEG₄-4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃; C₈₆H₁₃₅N₁₉O₂₂, розраховано (m/z): 1786,9, виявлено [M+K]⁺: 1811,1

Сполука 11: A = DOTA, B₁ = 15-аміно-4,7,10,13-тетраоксапентадеканоїл; B₂ = нема, Xaa₁ = DPhe; Xaa₂ = Gly;

15 DOTA-PEG₄-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃
C₇₈H₁₂₁N₁₇O₂₁, розраховано (m/z): 1632,8, виявлено [M+K]⁺: 1672,2

Приклад 4 (A-B-C-3)

DOTA-Спейсер-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-X_{aa3}¹³-X_{aa4}¹⁴-NH₂

20 Синтез кон'югатів бомбезину із загальною послідовністю : DOTA-Спейсер-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Leuψ(CH₂NH)-Phe-NH₂

а) Синтез пептиду: Fmoc-Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Leuψ(CH₂NH)-Phe-NH₂

Пептиди синтезували вручну на MBHA полімері LL (100-200 меш) HCl, використовуючи Boc стратегію. У цілому, MBHA полімер з теоретичним завантаженням 0,59 ммоль/г вводили в реактор і він набухав у ДХМ протягом 30 хвилин. Полімер обробляли 3 рази (10 хв.) з розчином 10 % DIPEA у ДХМ. Перше зв'язування Boc-Leuψ(CH₂NH)-Phe-OH здійснювали, використовуючи 2 еквіваленти Boc-амінокислоти, активованої з 2 еквівалентами HOBt і 2 еквівалентами DIC. Суміш для реакції зв'язування перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин і за здійсненням реакції спостерігали за допомогою Kaiser нінгідринного тесту. Boc-захист знімали, використовуючи 30 % ТФО в ДХМ, і цю стадію повторювали два рази. Після цього полімер обробляли розчином 10 % DIPEA у ДХМ і сполучення здійснювали, як описано вище.

(H-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-Phe-NH₂: C₅₆H₇₆N₁₄O₉, розраховано (m/z): 1089,3, виявлено [M+H]⁺: 1089,8

б) Зв'язування зі СПЕЙСЕРом і прохелатором DOTA (^tBu)₃

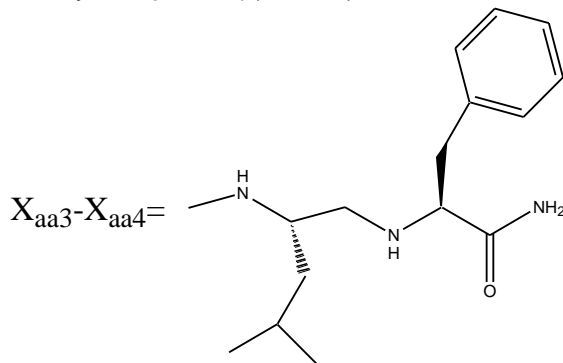
Зв'язування здійснювали, як описано вище.

35 в) Зняття захисту, відщеплення й очищення

Пептид обробляли із ТФО (1 мл) і TIS (30 мкл) і суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 5 хвилин. Потім суміш охолоджували на льодяній бані й по краплях додавали трифторометансульфонову кислоту (TFMSA) (100 мкл) при перемішуванні. Колбі запечатували пробкою й суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 години. Об'єм зменшували у вакуумі й пептид осаджувався при додаванні холодного діетилового ефіру. Осад декілька разів промивали діетиловим ефіром і неочищений продукт висушували у вакуумі. Неочищений продукт розчиняли у воді й очищали шляхом препаративної ВЕРХ, як описано вище.

45 Кон'югати аналізували шляхом аналітичної ВЕРХ із оберненою фазою й характеризували шляхом мас-спектроскопії (ESI-MS).

Сполука 12: A = DOTA, B₁ = 4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин; B₂ = нема, Xaa₁ = DPhe; Xaa₂ = Gly; Xaa₃ = Leuψ(CH₂NH); Xaa₄ = Phe



DOTA-4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu ψ (CH₂NH)-Phe-NH₂

C₇₉H₁₁₄N₂₀O₁₇, розраховано (m/z): 1615,9, виявлено [M+K]⁺: 1654,9

Синтез кон'югатів бомбезину із загальною послідовністю: DOTA-Спейсер-Хаа₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Хаа₂¹¹-His¹²-Leu ψ (CH₂NH)-Cys-NH₂

а) Синтез пептиду: Fmoc-Хаа₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Хаа₂¹¹-His¹²-Leu ψ (CH₂NH)-Cys-NH₂

Пептиди синтезували вручну за допомогою твердої фази на MBHA полімері (0,59 ммоль/г), використовуючи Вос-Стратегію. Вос-Cys(4-МеОBzl)-ОН (2,5 екв.) зв'язували з полімером, використовуючи DIC (2,5 екв.) і HOBt (2,5 екв.) як активуючий реагент. Значення pH доводили до 8 за допомогою DIPEA (5 екв.). Введення відновленого зв'язку ¹³Ψ¹⁴(CH₂-NH) здійснювали за допомогою Вос-Leu-альдегіду (2,5 екв.), розчиненого в підкисленому диметилформаміді. Повільно додавали NaBH₃CN (2,5 екв.) у ДМФА, протягом 20 хвилин, і реакцію перемішували протягом 1 години при КТ. Після утворення відновленого пептидного зв'язку, усі реакції зв'язування здійснювали з використанням N-Вос-захисених амінокислот.

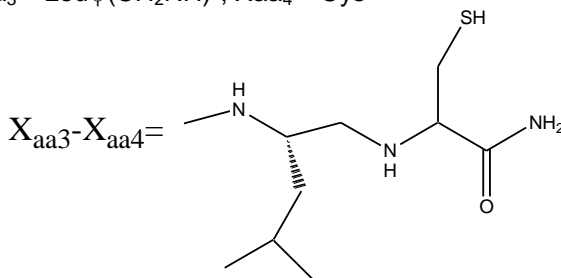
б) Зв'язування зі СПЕЙСЕРом і прохелатором DOTA (tBu)₃

Зв'язування здійснювали, як описано вище.

в) Зняття захисту, відщеплення й очищення

Зняття захисту, відщеплення й очищення здійснювали, як описано раніше. Кон'югати аналізували шляхом аналітичної ВЕРХ із оберненою фазою й характеризували шляхом мас-спектроскопії (ESI-MS).

Сполука 13: A = DOTA, B₁ = карбоксиметил-піперидин; B₂ = нема, Хаа₁ = DPhe; Хаа₂ = Gly; Хаа₃ = Leu ψ (CH₂NH)-; Хаа₄ = Cys



DOTA-4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu ψ (CH₂NH)-Cys-NH₂; C₇₃H₁₁₀N₂₀O₁₇S, розраховано (m/z): 1571,8, виявлено [M+Na]⁺: 1593,6

Приклад 4

Введення радіоактивної мітки в синтезовані кон'югати (сполуки 1-13)

Загальна процедура

До 10 мкг аліквоти кон'югату антагоніста пептиду хелатор-бомбезин у воді додавали 1-2 мкл водного розчину (¹¹¹InCl₃, ¹⁷⁷LuCl₃ або ^{67/68}GaCl₃) і 250-500 мкл 0,4М натрій-ацетатного буфера (pH=5). Цей розчин нагрівали протягом 30 хвилин при 95 °C і охолоджували до кімнатної температури протягом 10 хвилин. Аліквоту 5 мкл реакційної суміші додавали до 25 мкл Ca-DTPA розчину (0,1 M, pH 5,2) і аналізували за допомогою ВЕРХ для визначення кількості неміченого радіонукліда.

Приклад 5

Введення радіоактивної мітки в синтезовані кон'югати за допомогою ¹¹⁵In.

Комплексоутворення аналогів бомбезину з ^{nat}In здійснювали згідно з аналогічним протоколом. ^{nat}In використовували у формі ^{nat}InCl₃ розчину й при молярному співвідношенні 1:1.

Приклад 6 (In vitro дослідження)

Матеріали й методи для in vitro характеристики антагоністів GRP рецепторів

Реагенти й пептиди

Усі реагенти були найкращими з можливих класів і їх одержували з комерційних джерел. Мишине моноклональне антитіло з гемаглютиніновим (HA) епітопом одержували від Covance (Berkeley, CA). Вторинні антитіла Alexa Fluor 488 козячі антимишині IgG (H+L) одержували від Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). Бомбезин і антагоніст [D-Phe⁶, Leu-NHET¹³, des-Met¹⁴]-бомбезин(6-14) (GRPR-АНТАГ) одержували від Bachem (Bubendorf, Switzerland). RM26, RM1b, In-RM1b, і ¹⁷⁵Lu-AMBA були надані H.R. Mäcke (Basel, Switzerland). Набір для дослідження кальцію «Fluo-4NW Calcium Assay» одержували від Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR).

Клітинні лінії

Клітини нирки людських ембріонів 293 (HEK293), які стабільно експресують HA-епітоп, націлені на рецептор GRP людини (HEK-GRPR), створювали, як було описано раніше (Cescato та ін., 2008) і культивували при 37 °C і 5 % CO₂ у середовищі Ігла, модифікованому за способом

Дульбеко, з GlutaMAX™-I (DMEM), що містить 10 % (об./об.) фетальної бичачої сироватки (FBS), 100 од./мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину й 750 мкг/мл G418. Клітини раку передміхурової залози людини (PC3 клітини) одержували від DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ №: ACC465) і культивували при 37 °C і 5 % CO₂ у середовищі Хема F12K, що містить 2 мМ L-Глутаміну й доповненого 10 % (об./об.) FBS, 100 од./мл. пеніциліну й 100 мкг/мл стрептоміцину. Усі культуральні реагенти одержували від Gibco BRL (Grand Island, NY).

Вимірювання зв'язувальної здатності

Зв'язувальну здатність до GRP рецептора для різних сполук визначали шляхом авторадіографії рецепторів *in vitro* на криостатних зрізах або добре вивченому раку передміхурової залози, або на зрізах клітинної маси HEK-GRPR або PC3, як було описано раніше (Markwalder та ін., *Can. Res.*, 1999; 59, 1152-1159; Reubi та ін., *Eur. J. Nucl. Med.*, 2000; 27: 273-282; Reubi та ін., *Clin. Cancer Res.* 2002; 8 1139-1146). Використовуваними радіоактивними лігандами були ¹²⁵I-[Tyr⁴]-бомбезин, який, як відомо, переважно мітить GRP рецептори (Vigna та ін., *Gastroenterology*. 1987; 93: 1287-1295) і ¹²⁵I-[D-Tyr⁶, β-Ala¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]-бомбезин(6-14) як універсальний ліганд рецептора бомбезину (*Gastroenterology*. 1987; 93: 1287-1295).

Результати представлені в таблиці 1.

Імунофлуоресцентна мікроскопія

Імунофлуоресцентну мікроскопію, засновану на інтерналізації, з HEK-GRPR клітинами здійснювали, як було описано раніше (Cescato та ін., 2006; Cescato та ін., 2008). Коротко, HEK-GRPR клітини вирощували на покриті полі-D-лізином (20 мкг/мл) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 35 мм планшетах на 4 лунки (Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). Для експерименту, клітини обробляли або 10 нМ бомбезину, або 1 мкМ різних аналогів бомбезину, або, для оцінки потенційного антагонізму, 10 нМ бомбезину в присутності 100-кратного надлишку цих різних аналогів протягом 30 хвилин при 37 °C і 5 % CO₂ у ростовому середовищі, і потім обробляли для імунофлуоресцентної мікроскопії, використовуючи мишине моноклональне антитіло з НА-епітопом при розведенні 1:1,000 як первинне антитіло й Alexa Fluor 488 козяче антимішине IgG (H+L) при розведенні 1:600 як вторинне антитіло. Клітини візуалізували, використовуючи флуоресцентний мікроскоп Leica DM RB і камеру Olympus DP10.

Інтерналізації GRP рецептора, індукованій бомбезином, ефективно протидіяли аналоги бомбезину Сполука 1, In-Сполука 1, Сполука 1b і GRPR-АНТАГ. HEK-GRPR клітини обробляли протягом 30 хвилин або наповнювачем (без пептиду, а), або 10 нмоль/л бомбезину (b), концентрацією, яка індукує субмаксимальну інтерналізуючу дію. На панелях (d, f, h, j) представлені клітини, оброблені 10 нмоль/л бомбезину в присутності 1 мкмоль/л аналогів Сполуки 1b, GRPR-АНТАГ, Сполуки 1, і In-Сполуки 1. Дія Сполуки 1b, GRPR-АНТАГ, Сполуки 1, і In-Сполуки 1 окремо при концентрації 1 мкмоль/л презентована на панелях (c, e, g, i, k). Після інкубування з пептидами, клітини обробляли для імуноцитохімії, як описано вище. Чітке точкове перинуклеарне фарбування визначали для клітин, оброблених бомбезином. Це точкове фарбування ефективно знімається надлишком аналогів Сполука 1, In-Сполука 1, Сполука 1b і GRPR-АНТАГ. Сполука-1, In-Сполука 1, Сполука 1b і GRPR-АНТАГ при самостійному введенні не виявляють впливу на інтерналізацію GRP рецептора.

Див. результати в таблиці 1 і фігурі 2.

Дослідження вивільнення кальцію.

Внутрішньоклітинне вивільнення кальцію вимірювали в PC3 клітинах, використовуючи набір для аналізу кальцію «Fluo-4NW Calcium Assay», як описано раніше (Magrys та ін., *J. Clin. Immunol.* 2007, 27, 181-192; Michel та ін., *J. Nucl. Med.* 2008; 49: 318-326). Коротко, PC3 клітини висівали (10 тис. клітин лунку) у планшети на 96 лунок і культивували протягом 2 днів при 37 °C і 5 % CO₂ у культуральному середовищі. У день експерименту, клітини промивали буфером для аналізу (1 x HBSS, 20 мМ HEPES) що містить 2,5 мМ пробенециду, і потім додавали 100 мкл/лунку Fluo-4NW барвника в буфері для аналізу, що містить 2,5 мМ пробенециду протягом 30 хвилин при 37 °C і 5 % CO₂ і потім додатково протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Для вимірювання внутрішньоклітинної мобілізації кальцію після стимуляції тестованими аналогами бомбезину, клітини, до яких був доданий барвник, переносили в Spectramax M2^e (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Внутрішньоклітинну мобілізацію кальцію записували в кінетиці протягом 60 секунд при кімнатній температурі, спостерігаючи за випромінюванням флуоресценції при 520 нм (з λ_{ex} = 485 нм) у присутності аналогів у вказаних концентраціях. Максимальну флуоресценцію (F-max) вимірювали після додавання 25 мкМ іономіцину. Вимірювання вихідного рівня (F-baseline) проводили на необроблених клітинах з доданим барвником. Дані представлені у вигляді максимальної кальцієвої відповіді (F-max – F-baseline = 100 % максимальної кальцієвої відповіді), як було

описано раніше (Magrys та ін., J. Clin. Immunol. 2007, 27, 181-192; Michel та ін., Cescato та ін., J. Nucl. Med. 2008; 49: 318-326).). Усі досліді повторювали принаймні три рази в трьох повторях.

На фігурі 1 показано, що In-Сполука 1 і сполука 1а поведуться як антагоністи, зрушуючи криву залежності «доза-ефект» вправо в присутності бомбезину (BB).

Результати представлено в таблиці 1 і фігурі 1.

Сполука 1: DOTA-Gly-амінобензоїл-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Сполука 2: DOTA-4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Сполука 3: DOTA-4-аміно-1-піперидин-4-карбонова кислота-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Сполука 4: DOTA-15-аміно-4,7,10,13-тетраоксапентадеканова кислота-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Сполука 5: DOTA-(15-аміно-4,7,10,13-тетраоксапентадеканова кислота)-(4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин)-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Сполука 6: DOTA-діаміномасляна кислота-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Сполука 7: DOTA-4-(2-аміноетил)-1-карбоксиметил-пиперазин-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Сполука 8: DOTA-(5-аміно-3-окса-пентил)-напівамід янтарної кислоти-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Сполука 9: DOTA-4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃

Сполука 10: DOTA-(15-аміно-4,7,10,13-тетраоксапентадеканова кислота-4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин)-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃

Сполука 11: DOTA-15-аміно-4,7,10,13-тетраоксапентадеканова кислота -D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃

Сполука 12: DOTA-4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-Phe-NH₂

Сполука 13: DOTA-4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CH₂NH)-Cys-NH₂

Сполука 14: N₄-триаколи-dPEG₁-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂.

Таблица 1

Властивості аналогів BN щодо зв'язування, передачі сигналів і інтерналізації GRP рецептора при дослідженні in vitro

Сполука	Зв'язування IC ₅₀ (нМ) середнє значення ± СПС	Передача сигналів Ca ⁺⁺ мобілізація	Інтерналізація рецептора
1	30±4,5	АНТАГ / немає агоністичної дії	Антаг / немає агоністичної дії
¹¹⁵ In-1	16±5,3	АНТАГ / немає агоністичної дії	Антаг / немає агоністичної дії
2	9,7±3,8	АНТАГ / немає агоністичної дії	Антаг / немає агоністичної дії
¹¹⁵ In-2	9,3±1,9	АНТАГ / немає агоністичної дії	Антаг / немає агоністичної дії
3	43±14	АНТАГ / немає агоністичної дії	Антаг / немає агоністичної дії
4	21±6,5	АНТАГ / немає агоністичної дії	Антаг / немає агоністичної дії
5	7,3±0,6	АНТАГ / немає агоністичної дії	Антаг / немає агоністичної дії
6	7,4±2,2	АНТАГ / немає агоністичної дії	Антаг / немає агоністичної дії
7	11±0	NA	NA
8	19±3,0	NA	NA
9	3,2±1,3	АНТАГ / немає агоністичної дії	Антаг / немає агоністичної дії
¹¹⁵ In-9	2,5±0,2	АНТАГ / немає агоністичної дії	Антаг / немає агоністичної дії
10	6,9±0,5	АНТАГ / немає агоністичної дії	NA

Зв'язувальні здатності сполук 1, 2 і 9 вимірювали після комплексоутворення з ¹¹⁵In нерадіоактивним ізотопом. Отримані дані свідчать про те, що комплексоутворення з ізотопом не виявляє впливу на здатність зв'язуватися з рецептором, а також на антагоністичні властивості.

Стандартні методи в релевантних публікаціях:

Cescato R, Schulz S, Waser B, та ін. Internalization of sst2, sst3 and sst5 receptors: Effects of somatostatin agonists and antagonists. J. Nucl. Med., 2006;47:502-511.

Cescato R, Maina T, Nock B, Nikolopoulou A, Charalambidis D, Piccand V, Reubi JC. Bombesin Receptor Antagonists May Be Preferable to Agonists for Tumor Targeting. J. Nucl. Med.. 2008; 49:318-326.

5 Magrys, A.; Anekonda, T.; Ren, G.; Adamus, G. The role of anti-alpha-enolase autoantibodies in pathogenicity of autoimmune-mediated retinopathy. J. Cescatommunol. 2007, 27, 181-192.

Markwalder R, Reubi JC. Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. Cancer Res. 1999;59:1152-1159.

10 Mainal, N.; Ganter, K.; Venzke, S.; Bitzegeio, J.; Fackler, O. T.; Kepplet, O. T. The Nockprotein of human immunodeficiency virus is a broad-spectrum modulator of chemokine receptor cell surface levels that acts independently of classical motifs for receptor endocytosis and Galphai signaling. Mol. Biol.Cell.2006, 17, 3578-3590.

Reubi JC, Schaer JC, Waser B, и др. Affinity profiles for human somatostatin receptor sst1-sst5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. Eur. J. Nikolopoulou 2000; 27: 273-282.

15 Reubi JC, Wenger S, Schmuckli-Maurer J, и др. Bombesin Receptor Subtypes in Human Cancers: Detection with the Universal Radioligand (125)I-[D-TYR(6), beta-ALA(11), PHE(13), NLE(14)] Bombesin(6-14). Charalambidisres., 2002;8:1139-1146.

Vigna SR, Mantyh CR, Giraud AS, и др. Localization of specific binding sites for bombesin in the canine gastrointestinal tract. Gastroenterology. 1987;93:1287-1295.

20 Приклад 7

Дослідження біорозподілу в «голих» мишей, що несуть PC-3 пухлину

Самкам «голих» мишей підшкірно імплантували 10 мільйонів PC-3 пухлинних клітин, які перед цим розводили в стерилізованому фосфатно-сольовому буферному розчині (PBS, pH 7,4). Через одинадцять днів після інюкуляції, мишам ін'єкували у хвостову вену 10 пмоль радіоактивно мічених пептидів (близько 0,18 МБк), розведених в NaCl (0,1 % бичачий сироватковий альбумін, pH 7,4, сумарний ін'єкований об'єм =100 мкл). Для визначення неспецифічного поглинання пухлиною або рецептор-позитивними органами, груп з 4 тварин попередньо ін'єкували 0,02 мкмоль неміченого пептиду в 0,9 % розчині NaCl і через 5 хвилин ін'єкували радіоактивно мічений пептид. В інтервали 1, 4, 24, 48, і 72 годин, мишей (у групах 3-4) умиротворяли і органи, що представляють інтерес, збирали, промивали від надлишків крові, зважували й імпульси підраховували на γ-лічильнику.

¹¹¹In-СПОЛУКА 1

¹¹¹In- DOTA-Gly-амінобензоїл-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Ін'єкована кількість:	5 мкКі / 10 пмоль / 100 мкл/мишу
Блокувальна сполука	2000-кратне
Тварина:	«голі» миші, що несуть PC3 пухлину; 3 миші/групу
Момент часу:	1 год., 4 год., 4 год. блокування, 24 год., 48 год., 72 год.

35

Орган	1 година	4 години	4 години блокування	24 години	48 годин	72 години
кров	0,86±0,17	0,04±0,00	0,02±0,01	0,01±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
серце	0,28±0,05	0,04±0,01	0,04±0,01	0,03±0,01	0,00±0,00	0,01±0,00
Печінка	1,93±0,29	0,38±0,05	0,39±0,08	0,19±0,01	0,10±0,01	0,09±0,02
селезінка	0,57±0,21	0,12±0,01	0,09±0,01	0,05±0,01	0,04±0,01	0,02±0,00
легені	0,82±0,13	0,12±0,04	0,10±0,03	0,05±0,01	0,02±0,01	0,01±0,00
нирки	3,99±0,33	1,93±0,18	2,67±0,10	1,01±0,06	0,50±0,09	0,28±0,02
шлунок	3,31±0,63	0,76±0,14	0,07±0,03	0,05±0,02	0,01±0,00	0,02±0,01
кишечник	1,73±0,48	0,20±0,10	0,07±0,01	0,04±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00
надниркова залоза	4,14±1,46	1,20±0,12	0,10±0,06	1,24±0,16	0,38±0,09	0,36±0,04
підшлункова залоза	21,92±1,34	1,32±0,31	0,07±0,02	0,15±0,02	0,06±0,01	0,06±0,01
гіпофіз	7,80±1,90	0,85±0,45	0,11±0,09	0,21±0,19	0,03±0,03	0,05±0,07
м'язи	0,19±0,06	0,03±0,01	0,02±0,00	0,03±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
кісткова тканина	0,40±0,10	0,18±0,07	0,04±0,01	0,14±0,03	0,03±0,00	0,03±0,01
пухлина	14,24±1,75	13,46±0,80	0,46±0,00	6,58±1,14	2,08±0,12	1,31±0,23

Пухлина до тканини	1 година	4 години	24 години	48 годин	72 години
пухлина:нирки	3,6	7,0	6,5	4,2	4,7
пухлина:печінка	7,4	35,4	34,6	20,8	14,5
пухлина: кров	16,5	336,5	658,0	1600,0	1871,4
пухлина:м'язи	75,0	448,7	219,3	693,3	1091,7

⁶⁸Ga-СПОЛУКА 1⁶⁸Ga-DOTA-Gly-амінобензоїл-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Тварина:	«голі» миші, що несуть РС3 пухлина; 3 миші/групу
Ін'єкована кількість:	1,27 мкКі / 10 пмоль / 100 мкл/мишу
Блокувальна сполука	3000-кратна Сполука 1
Момент часу:	1 година, 1 година блокування, 2 години,

5

Орган	1 година	1 година блокування	2 години
кров	0,86±0,09	0,55±0,30	0,39±0,15
серце	0,33±0,21	0,30±0,18	0,14±0,02
Печінка	1,14±0,37	1,05±0,60	0,98±0,32
селезінка	1,29±0,53	0,08±0,05	0,08±0,01
легені	0,80±0,33	0,71±0,23	0,21±0,09
нирки	2,79±0,39	3,18±1,79	1,21±0,12
шлунок	3,09±0,51	0,41±0,31	1,68±0,02
кишечник	2,09±0,17	1,06±0,55	5,39±0,52
надниркова залоза	3,31±0,78	0,07±0,06	0,89±0,62
підшлункова залоза	27,84±4,88	0,96±0,45	10,73±2,76
гіпофіз	13,35±1,32	0,28±0,08	0,22±0,00
м'язи	0,26±0,08	0,07±0,05	0,20±0,02
кісткова тканина	0,03±0,01	0,18±0,11	0,03±0,01
пухлина	8,71±0,67	2,04±1,04	10,45±1,61

	1 година	2 години
пухлина:нирки	3,13	8,64
пухлина:печінка	7,66	10,68
пухлина:підшлункова залоза	0,31	0,97
пухлина:кров	10,18	27,08
пухлина:м'язи	33,74	53,51

¹¹¹In-СПОЛУКА 2¹¹¹In-DOTA-4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

10

Ін'єкована кількість:	5 мкКі / 10 пмоль / 100 мкл/мишу
Блокувальна сполука	2000-кратне
Тварина:	«голі» миші, що несуть РС3 пухлину; 3 миші/групу
Момент часу:	1 год., 4 год., 4 год. блокування, 24 год., 48 год., 72 год.

Орган	1 година	4 години	4 години блокування	24 години	48 годин	72 години
кров	0,77±0,28	0,05±0,04	0,13±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
серце	0,32±0,09	0,04±0,03	0,09±0,01	0,02±0,01	0,01±0,00	0,02±0,02
Печінка	0,49±0,12	0,18±0,06	0,34±0,03	0,09±0,01	0,07±0,01	0,06±0,02
селезінка	0,53±0,20	0,12±0,06	0,16±0,02	0,06±0,02	0,05±0,01	0,06±0,03
легені	0,70±0,30	0,10±0,07	0,19±0,01	0,04±0,03	0,11±0,24	0,04±0,02
нирки	4,78±1,11	2,14±0,73	2,98±0,20	1,25±0,16	0,91±0,09	0,74±0,18
шлунок	3,15±0,78	1,07±0,15	0,12±0,02	0,06±0,02	0,03±0,01	0,05±0,01
кишечник	2,11 ±0,47	0,25±0,15	0,11±0,01	0,04±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01
надниркова залоза	3,46±2,07	1,17±0,54	1,10±0,60	0,71±0,29	0,54±0,29	1,01±0,74

підшлункова залоза	22,64±4,71	1,55±0,48	0,10±0,00	0,32±0,09	0,19±0,04	0,19±0,02
гіпофіз	7,00±5,68	0,59±0,55	0,58±0,49	0,07±0,33	0,21±0,33	0,51±0,24
м'язи	0,29±0,17	0,05±0,04	0,06±0,02	0,02±0,01	0,01±0,01	0,02±0,01
кісткова тканина	0,91±0,68	0,35±0,57	0,35±0,11	0,20±0,18	0,12±0,11	0,15±0,05
пухлина	15,23±4,78	11,75±2,43	0,45±0,04	6,84±1,02	4,67±0,39	4,07±0,34

Пухлина до тканини	1 година	4 години	24 години	48 годин	72 години
пухлина:нирки	3,2	5,5	5,5	5,1	5,5
пухлина:печінка	30,9	64,6	74,1	67,2	63,0
пухлина:кров	19,9	243,9	2744,6	3823,7	3391,2
пухлина:підшлункова залоза	0,7	7,6	21,4	24,6	21,4
пухлина:м'язи	52,0	260,2	436,6	354,5	165,4

⁶⁸Ga-СПОЛУКА 2

⁶⁸Ga-DOTA-4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

5

Радіоактивний ліганд:	⁶⁸ Ga-СПОЛУКА 2
Тварина:	«голі» миші, що несуть РСЗ пухлина; 3 миші/групу
Ін'єкована кількість:	1,27 мкКі / 10 пмоль / 100 мкл/мишу
Момент часу:	1 година

Орган	1 година
кров	0,45±0,01
серце	0,19±0,02
Печінка	0,41±0,04
селезінка	0,36±0,01
легені	0,34±0,03
нирки	1,87±0,08
шлунок	2,13±0,34
кишечник	1,54±0,22
надниркова залоза	2,48±0,48
підшлункова залоза	11,63±0,19
гіпофіз	0,36±0,19
м'язи	0,13±0,00
кісткова тканина	0,23±0,03
пухлина	9,31±1,58

	1 година
пухлина:нирки	4,98
пухлина:печінка	22,60
пухлина:підшлункова залоза	0,80
пухлина:кров	20,85
пухлина:м'язи	74,02

¹¹¹In-Сполука 4

¹¹¹In-DOTA-(15-аміно-4,7,10,13-тетраоксапентадеканова кислота)-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

10

Ін'єкована кількість:	5 мкКі / 10 пмоль / 100 мкл/мишу
Блокувальна сполука	2000-кратне
Тварина:	«голі» миші, що несуть РСЗ пухлину; 3 миші/групу
Момент часу:	1 год., 4 год., 4 год. блокування, 24 год., 48 год., 72 год.

Орган	1 година	4 години	4 години блокування	24 години
кров	0,21 ±0,02	0,02±0,00	0,01±0,00	0,00±0,00
серце	0,08±0,01	0,02±0,00	0,02±0,00	0,00±0,00
Печінка	0,22±0,01	0,09±0,01	0,09±0,01	0,03±0,01
селезінка	0,18±0,10	0,07±0,02	0,04±0,01	0,01±0,00
легені	0,24±0,01	0,07±0,01	0,04±0,01	0,01±0,01
нирки	1,85±0,15	1,38±0,37	1,40±0,29	0,24±0,01
шлунок	2,01±0,36	0,56±0,18	0,03±0,01	0,01±0,01
кишечник	1,16±0,24	0,10±0,04	0,05±0,04	0,02±0,00
надниркова залоза	2,18±0,93	0,86±0,17	0,07±0,06	0,59±0,16
підшлункова залоза	10,96±0,57	0,52±0,05	0,02±0,00	0,01±0,01
гіпофіз	4,23±1,46	0,55±0,20	0,17±0,10	0,00±0,00
м'язи	0,08±0,02	0,02±0,01	0,01±0,00	0,00±0,00
кісткова тканина	0,16±0,06	0,12±0,04	0,02±0,01	0,04±0,02
пухлина	10,56±0,70	8,63±1,13	0,45±0,06	3,23±0,52

Пухлина до тканини	1 година	4 години	24 години
пухлина:нирки	5,71	6,27	13,40
пухлина:підшлункова залоза	0,96	16,71	345,16
пухлина:кров	49,67	552,10	3457,24
пухлина:м'язи	140,10	349,48	808,55
пухлина:кісткова тканина	64,16	71,75	86,62

- 5 ¹¹¹In-Сполука 5
¹¹¹In-DOTA-(15-аміно-4,7,10,13-тетраоксапентадеканова кислота)-(4-аміно-1-карбокси-метил-піперидин)-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

Тварина:	«голі» миші, що несуть РС3 пухлину; 3~4 миші/групу
Ін'єкована кількість:	5 мкКі / 10 пмоль / 100 мкл/мишу
Блокувальна сполука	2000-кратне
Момент часу:	1 год., 4 год., 4 год. блокування, 24 год.

Орган	1 година	4 години блокування	4 години	24 години
кров	0,75±0,21	0,02±0,00	0,03±0,01	0,01±0,00
серце	0,28±0,06	0,02±0,00	0,03±0,01	0,02±0,00
Печінка	0,40±0,09	0,14±0,01	0,15±0,05	0,11±0,02
селезінка	0,80±0,28	0,06±0,01	0,09±0,03	0,07±0,01
легені	0,62±0,15	0,05±0,01	0,15±0,19	0,51±0,73
нирки	5,08±0,72	1,76±0,36	2,04±0,15	1,37±0,22
шлунок	3,92±1,26	0,06±0,01	0,87±0,58	0,05±0,01
кишечник	2,39±0,42	0,03±0,01	0,17±0,10	0,05±0,02
надниркова залоза	3,63±0,53	0,07±0,02	0,68±0,31	0,62±0,16
підшлункова залоза	26,83±4,34	0,06±0,02	1,36±0,81	0,33±0,05
гіпофіз	9,02±0,99	0,23±0,14	0,38±0,16	0,46±0,52
м'язи	0,19±0,07	0,01±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00
кісткова тканина	0,34±0,04	0,03±0,03	0,08±0,02	0,08±0,02
пухлина	10,27±0,36	0,61±0,07	9,35±0,73	6,33±0,76

Пухлина до тканини	1 година	4 години	24 години
пухлина:кров	13,73	319,66	1155,51
пухлина: нирки	2,02	4,59	4,62
пухлина:підшлункова залоза	0,38	6,90	19,16
пухлина:м'язи	53,65	475,17	364,92
пухлина:кісткова тканина	29,93	124,55	76,65

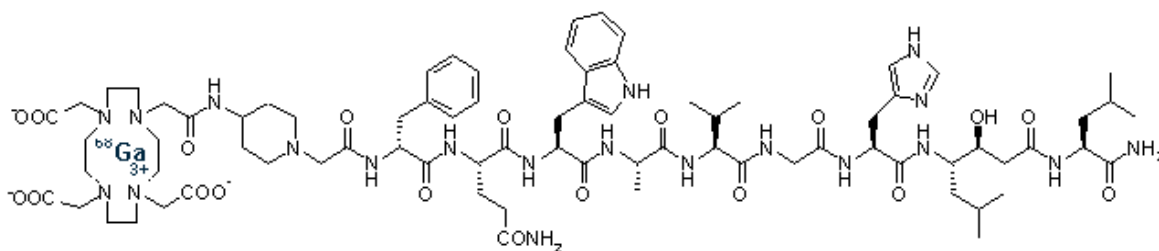
- ¹¹¹In-Сполука 9
¹¹¹In-DOTA- DOTA-4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leuψ(CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃
- 5

Ін'єкована кількість:	5 мкКі / 10 пмоль / 100 мкл/мишу
Блокувальна сполука	2000-кратне
Тварина:	«голі» миші, що несуть PC3 пухлину; 3 миші/групу
Момент часу:	1 год., 4 год., 4 год. блокування, 24 год., 48 год., 72 год.

Орган	1 година	4 години	4 години блокування	24 години	48 годин	72 години
кров	0,43±0,10	0,12±0,03	0,04±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00
серце	0,17±0,03	0,09±0,02	0,15±0,05	0,03±0,01	0,02±0,00	0,08±0,03
Печінка	0,73±0,12	0,49±0,14	0,40±0,02	0,20±0,02	0,11 ±0,01	0,10±0,02
селезінка	1,13±0,41	0,57±0,24	0,23±0,03	0,21±0,06	0,15±0,04	0,15±0,04
легені	0,45±0,05	0,21±0,06	0,38±0,06	0,08±0,04	0,05±0,02	0,18±0,07
нирки	5,23±3,01	2,43±0,47	2,88±1,52	1,41 ±0,22	0,97±0,06	0,55±0,15
шлунок	4,43±2,48	5,72±4,04	0,16±0,03	1,08±0,15	0,43±0,10	0,28±0,09
кишечник	3,61 ±0,61	3,31±1,61	0,14±0,02	0,35±0,05	0,16±0,07	0,10±0,01
надниркова залоза	10,66±2,64	5,16±1,55	1,36±0,56	2,31±0,96	2,24±1,43	1,84±0,36
підшлункова залоза	65,69±8,14	39,80±9,25	0,18±0,04	4,52±0,53	2,30±0,19	1,06±0,19
гіпофіз	12,63±3,26	5,54±2,07	3,72±1,62	0,71 ±0,37	0,56±0,24	2,56±0,28
м'язи	0,22±0,06	0,14±0,04	0,13±0,07	0,05±0,01	0,03±0,01	0,08±0,04
кісткова тканина	1,31±1,29	0,71±0,25	1,61±0,52	0,29±0,14	0,23±0,13	1,08±0,83
пухлина	9,18±1,16	13,17±5,01	0,38±0,08	8,39±0,88	5,89±0,351	3,04±1,44

Пухлина до тканини	1 година	4 години	24 години	48 годин	72 години
пухлина:нирки	1,8	5,4	6,0	6,1	6,2
пухлина:печінка	12,7	26,7	42,4	53,0	35,0
пухлина:кров	21,1	109,7	631,4	803,8	304,0
пухлина:підшлункова залоза	0,2	0,3	1,9	2,6	2,9
пухлина:м'язи	42,6	94,7	169,2	191,9	42,9

- 10 Приклад 8
- PET/ CT-Візуалізація, експеримент біорозподілу в мишей, що несуть пухлину PC-3 і LNCaP при впливі Ga-68-DOTA Сполуки 2, зв'язувальна здатність і стабільність
 Візуалізація + Біорозподіл
 Сполука 2: DOTA-4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂
- 15



Емпірична формула: C₇₈H₁₁₅N₂₀O₁₉Ga; Молекулярна вага: 1704,89

5 Ga-68-DOTA- Сполуку 2 візуалізували на microPET/ CT (Inveon, Siemens) у мишей, що несуть пухлину PC-3 і LNCaP, через 1 годину після ін'єкції 10 МБк радіоактивного індикатору. Внаслідок швидкого ниркового кліренсу цього антагоніста бомбезину спостерігали дуже низьку фонову активність при незначному всмоктуванні в нирках і в сечовому міхурі. Висока видимість контрастної пухлини в обох ксенотрансплантах ефективно блокувалася або 100 мкг бомбезину або самою нерадіоактивною Сполукою 2. Рецептори бомбезину ефективно
10 блокувалися за допомогою бомбезину, що приводило до критичної втрати сигналу в пухлині фігура 3a і 3b у мишей, що несуть пухлину PC-3, + фігура 4a і 4b у мишей, що несуть пухлину LNCaP).

Зв'язувальна здатність

Зв'язувальну здатність Ga-68-DOTA- Сполуки 2 до GRPr визначали за допомогою двох
15 різних методів, що включають авторадіографію рецептора на тканинах людини й клітинне дослідження, використовуючи PC-3 клітини. Обидва методи вказували на високу зв'язувальну здатність Сполуки 2 з IC₅₀ ~8 нМ на підставі нерадіоактивної DOTA-Сполуки 2 пептиду.

Стабільність у плазмі й мікросомах мишей

20 Ga-68-DOTA- Сполука 2 проявляло гарну метаболічну стабільність, яку вимірювали за допомогою різних методів in vitro і in vivo. Стабільність у плазмі в умовах in vivo Ga-68-DOTA- Сполуки 2 досліджували в мишей без пухлини. Кров і мочу аналізували за допомогою ВЕРХ через 1, 3, 5, 10 і 15 після внутрішньовенної ін'єкції близько 20 МБк Ga-68-DOTA- Сполуки 2 (Фігура 10a, b, c, d, e). Через декілька хвилин, було виявлено незначне розкладання в плазмі радіоактивного індикатору, на що вказувала наявність двох дуже невеликих / полярних метаболітів при часі утримання 1,3 хвилини й 1,5 хвилини, які також виявлялися як основні метаболіти у сечі. Сама сполука проявляє час утримання 11,6-11,7, при цьому подвійний пік спостерігається, починаючи з 5 хвилин після ін'єкції.

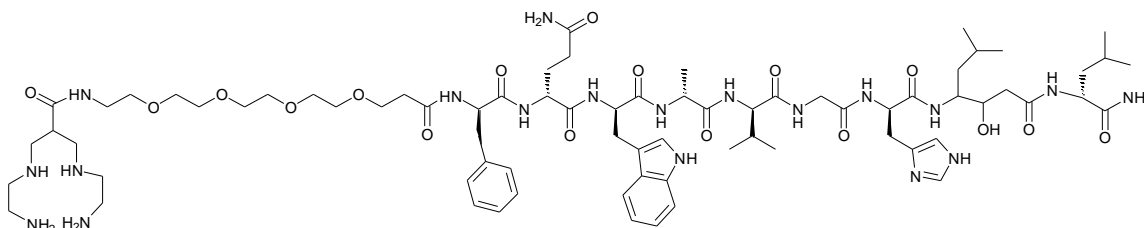
Мікросомальну стабільність Ga-68-DOTA- Сполуки 2 визначали, використовуючи мікросоми мишей і людини, інкубовані з радіоактивним індикатором, і їх аналізували за допомогою ВЕРХ.
30 Не було виявлено розкладання Ga-68-DOTA- Сполуки 2 у мікросомах мишей або людини. Незначні домішки, виявлені на хроматограмах, також спостерігали без мікросомального кофактора.

Приклад 9

35 СPECT/ СТ-Візуалізація й дослідження біорозподілу ^{99m}Tc-ARN4-06 у мишей, що несуть PC-3-пухлину

Див. вищеописаний протокол дослідіу

Радіоактивний ліганд:	^{99m} Tc-ARN4-06
Тварина:	«голі» миші, що несуть PC-3 пухлину; 3 миші/групу
Ін'єкована кількість:	10 мкКі / 10 пмоль / 100 мкл/мишу
Момент часу:	1 година, 4 години й 24 години



40

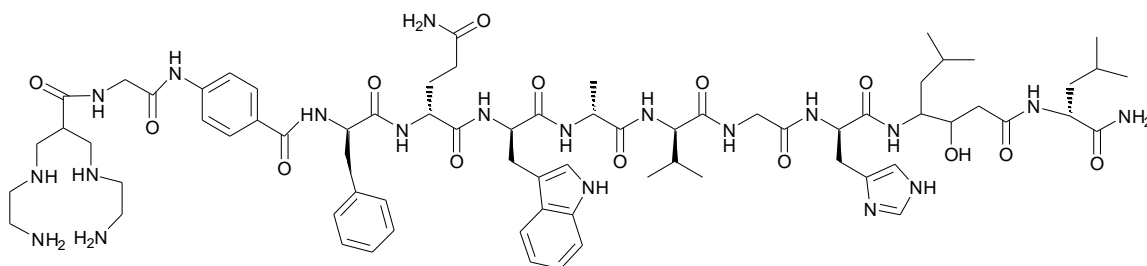
орган	1 година	Средньокв. відх..	4 години	Средньокв. відх..	24 години	Средньокв. відх..
кров	1,32	0,07	0,33	0,05	0,04	0,01
серце	0,64	0,15	0,22	0,03	0,10	0,04
печінка	6,31	1,16	3,62	1,16	1,19	0,36
селезінка	3,91	0,66	1,29	0,53	0,87	0,18
легені	5,11	1,00	3,17	1,51	1,69	0,84
ліва нирка	6,55	0,59	2,73	0,42	1,28	0,30
шлунок	8,09	1,45	5,44	1,26	0,61	0,19
кишечник	8,41	2,39	2,02	0,80	0,16	0,08
надниркова залоза	11,99	1,62	6,31	0,27	1,41	0,45
підшлункова залоза	72,50	8,98	11,18	2,89	0,41	0,20
гіпофіз	6,86	2,85	2,12	0,59	0,83	0,31
м'язи	0,27	0,03	0,07	0,00	0,18	0,12
кісткова тканина	0,78	0,13	0,45	0,18	0,35	0,20
пухлина	28,66	1,75	34,68	3,71	18,40	2,58
Нирки	6,26	0,48	2,84	0,49	1,24	0,32

Співвідношення Пухлина:Орган	1 година	4 години	24 години
пухлина:кров	20,79	85,11	455,94
пухлина:серце	36,75	150,38	176,45
пухлина:печінка	4,37	9,50	15,47
пухлина:селезінка	7,50	20,51	21,05
пухлина:легені	5,64	11,78	10,88
пухлина:нирки	4,26	12,92	14,35
пухлина:шлунок	3,32	5,83	30,02
пухлина:кишечник	3,20	16,51	117,53
пухлина:надниркова залоза	2,31	2,62	13,07
пухлина:підшлункова залоза	0,38	3,28	44,93
пухлина:гіпофіз	4,43	4,40	22,14
пухлина:м'язи	116,82	283,06	99,65
пухлина:кісткова тканина	34,10	35,16	52,06
пухлина:нирки	4,25	12,25	14,87

- 5 На фігурі 6 показано СPECT/CT зображення для ^{99m}Tc -ARN4-06 (15 МБк/200 пмоль)
 Приклад 10
 СPECT/CT- візуалізація й дослідження біорозподілу для ^{99m}Tc -ARN4-05 у мишей, що несуть РС-3-пухлину
 Див. вищеописаний протокол дослідіу

Радіоактивний ліганд:	^{99m}Tc -ARN4-05
Тварина:	«голі» миші, що несуть РС-3 пухлину; 6-9 мишей/групу
Ін'єкована кількість:	10 мкКі /10 пмоль / 100 мкл/мишу
Момент часу:	1 година, 4 години, 24 години

10



орган	1 година	Средньокв. відх..	4 години	Средньокв. відх..	24 години	Средньокв. відх..
кров	1,69	0,14	0,40	0,05	0,09	0,02
серце	0,68	0,02	0,20	0,03	0,14	0,07
печінка	12,32	1,01	7,75	0,62	3,88	0,40
селезінка	4,00	0,60	1,72	0,34	0,83	0,22
легені	3,11	0,47	1,24	0,41	1,15	1,47
ліва нирка	10,50	1,20	6,12	1,17	1,42	0,13
шлунок	5,68	0,01	4,86	1,04	0,42	0,15
кишечник	6,97	1,57	2,12	0,37	0,12	0,01
надниркова залоза	19,05	3,06	7,91	2,70	2,08	0,31
підшлункова залоза	64,86	6,72	19,86	2,35	0,57	0,21
гіпофіз	3,67	2,03	1,15	0,11	1,53	1,33
м'язи	0,43	0,16	0,08	0,02	0,11	0,04
кісткова тканина	1,34	0,26	0,57	0,11	0,41	0,19
пухлина	22,50	2,62	29,91	4,00	15,16	0,45

Співвідношення Пухлина:Орган	1 година	4 години	24 години
пухлина:кров	13,30	74,77	167,74
пухлина:серце	33,19	149,55	105,06
пухлина:печінка	1,83	3,86	3,91
пухлина:селезінка	5,62	17,41	18,21
пухлина:легені	7,24	24,11	13,21
пухлина:нирки	2,14	4,89	10,71
пухлина:шлунок	3,96	6,15	35,99
пухлина:кишечник	3,23	14,09	129,43
пухлина:надниркова залоза	1,18	3,78	7,30
пухлина:підшлункова залоза	0,35	1,51	26,66
пухлина:гіпофіз	6,14	25,96	9,93
пухлина:м'язи	52,54	364,22	133,21
пухлина:кісткова тканина	16,80	52,85	37,06

5 На фігурі 8 показане СPECT/CT зображення ^{99m}Tc -ARN4-05 (15 МБк/200 пмоль)

Приклад 11

Синтез Ga-68-DOTA Сполуки 2

Стадія 1: Нерадіоактивні пептиди синтезували шляхом твердофазного пептидного синтезу (SPPS) відповідно до стандартної Fmoc стратегії, використовуючи Rink амід полімер на полістирольній основі.

Стадія 2:

350 мкл 0,25M HEPES в Wheaton V-посудині

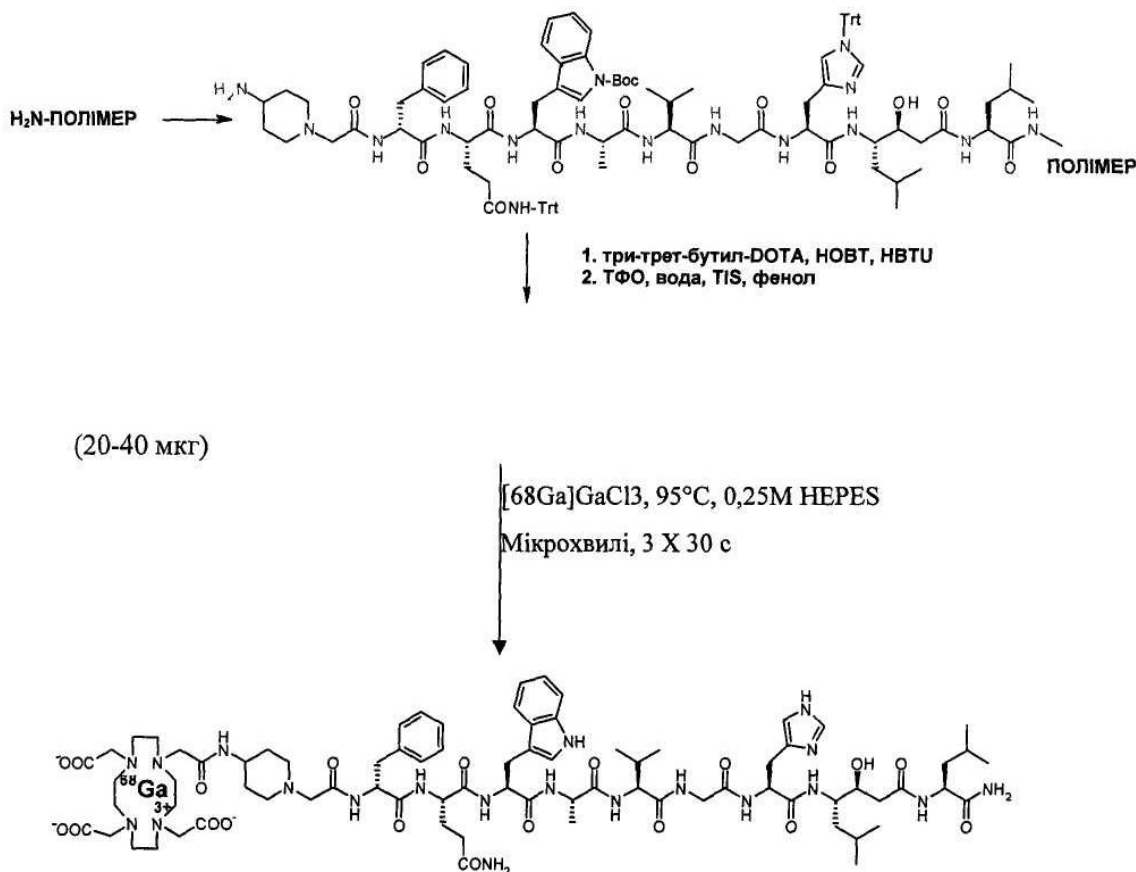
- Додавали $[^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ в 400 мкл 97,6 % ацетону/0,05 н. HCl

- Значення pH доводили до ~3,5 за допомогою 0,1M HCl

- Додавали 40 мкг пептиду в 40 мкл води

5

- Нагрівали 75 Вт (95 °C) протягом 30 с
- Відстоювали протягом 30 с
- Повторювали нагрівання й відстоювання ще три рази
- Додавали 5 мл води до реакційної суміші
- Імобілізували на tC18 Light SPE
- Промивали водою (5 мл)
- Елюювали EtOH (500 мкл)



10

Радіохімічний вихід (не оптимізований)	79 –231 МБк (32 – 60 % d.c.)
Вихідна активність	189 - 593 МБк
Без радіоактивної мітки	10
Помилки	0
Радіохімічна чистота	>98 % (за допомогою ВЕРХ і ITLC)
Питома активність	3,2 – 11,8 ГБк/мкмоль

На фігурі 9 показаний ВЕРХ аналіз для Ga-68-DOTA Сполуки 2 на колонці із оберненою фазою.

Чистота продукту

Колонка: ACE 5μ C18 50 x 4,6мм

Розчинник: Розчинник А: H₂O + 0,1 %ТФО

Розчинник В: MeCN + 0,1 %ТФО

Гradient: 5 – 95 % за 7 хв.

Потік. 2 мл/хв.

15

Приклад 12

Стабільність у сироватці Lu-177-DOTA Сполуки 2

Сполука 2: DOTA-4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂

20

Стабільність у сироватці Lu-177-DOTA Сполуки 2, радіоактивно міченої за допомогою Lu-177, також досліджували в сироватці крові людини. Після інкубування протягом 96 годин Lu-177-DOTA Сполуки 2 у сироватці людини усе ще зберігалось 70 % сполуки, на що вказував

аналіз за допомогою ВЕРХ (Фігура 2). До 1 мл свіжоприготовленої сироватки людини, попередньо врівноваженої в 5 % CO₂ середовищі при 37 °С, додавали 0,03 нмоль стандартного розчину ¹⁷⁷ Lu-міченого пептиду. Суміш інкубували в середовищі 5 % CO₂, 37 °С. У різні проміжки часу, 100-мкл аліквоти (у трьох повторах) видаляли й обробляли з 200 мкл EtOH для осадження сироваткових білків. Після цього проби центрифугували протягом 15 хвилин при 5000 об./хв. 50 мкл супернатанта видаляли для підрахунку активності на γ-лічильнику для лунок, осад промивали два рази за допомогою 1 мл EtOH і підраховували, і активність у супернатанті порівнювали з активністю в осаді після центрифугування для одержання відсотка пептидів, незв'язаних з білками, або радіоактивного металу, перенесеного на білки сироватки. Супернатант аналізували за допомогою ВЕРХ (елюенти: А = 0,1 % трифтороцтова кислота у воді й В = ацетонітрил; градієнт : 0 хв. 95 % А; 20 хвилин 50 % А) для визначення стабільності пептиду в сироватці.

На фігурі 11 показана стабільність Lu-177-DOTA Сполуки 2 у сироватці людини.

Приклад 13

Порівняння з F 18-холіном і F18-FDG

Біорозподіл Ga-68 RM2 див. в таблиці нижче

Ga-68-	DOTA-	4-аміно-1-карбоксиметил-піперидин-	D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH ₂
--------	-------	------------------------------------	---

Через 1 годину після ін'єкції мишей, що несуть PC-3 пухлину, порівнювали з F-18 індикатором [¹⁸F]фторетилхолін (FEC), який використовують для візуалізації раку передміхурової залози, і FDG золотий стандарт F18 індикатор в онкології. Високі співвідношення пухлина- до-тканини підкреслюють діагностичну корисність Ga-68 сполуки RM2 для PET візуалізації

Див. фігуру 12.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Кон'югат антагоніста пептиду аналога бомбезину, який має загальну формулу (I)

(I) [A-(B)_n]_x-C,

де

x являє собою ціле число від 1 до 3,

n являє собою ціле число від 1 до 6,

A являє собою хелатор металу, що містить принаймні один радіонуклідний метал,

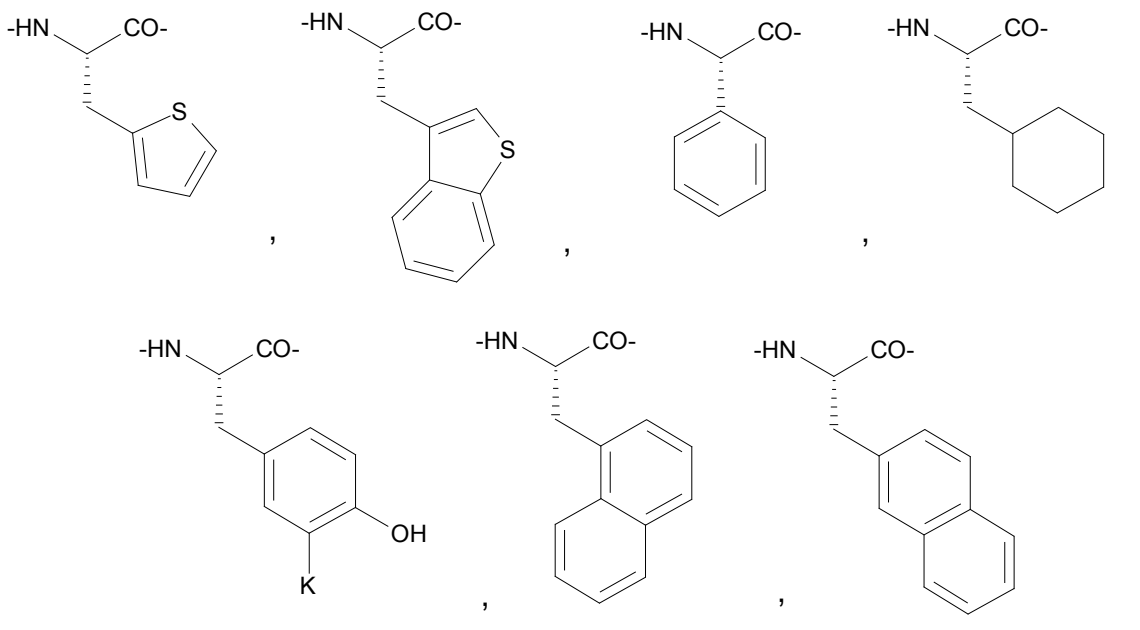
B являє собою спейсер, зв'язаний з N-кінцем C, або ковалентний зв'язок,

C являє собою антагоніст пептиду аналога бомбезину з послідовністю C-1 - C-4, де:

C-1: Xaa₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Xaa₂¹¹-His¹²-Xaa₃¹³-Xaa₄¹⁴-NH₂,

де:

Xaa₁ являє собою D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp або залишок, що має будь-яку з формул, представлених нижче



К являє собою F, Cl, I або NO_2 ,

Хаа₂ являє собою Gly або β -Ala,

Хаа₃ являє собою статин, аналоги й ізомери статину, 4-Am, 5-MeHрA, 4-At, 5-MeHxA

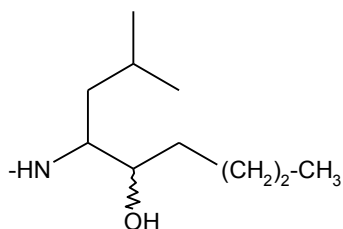
5 або α -заміщені амінокислоти,

Хаа₄ являє собою Leu, Cpa, Cba, CpnA, Cha, t-buGly, tBuAla, Met, Nle, або ізо-Bu-Gly, і

Z являє собою NH, O;

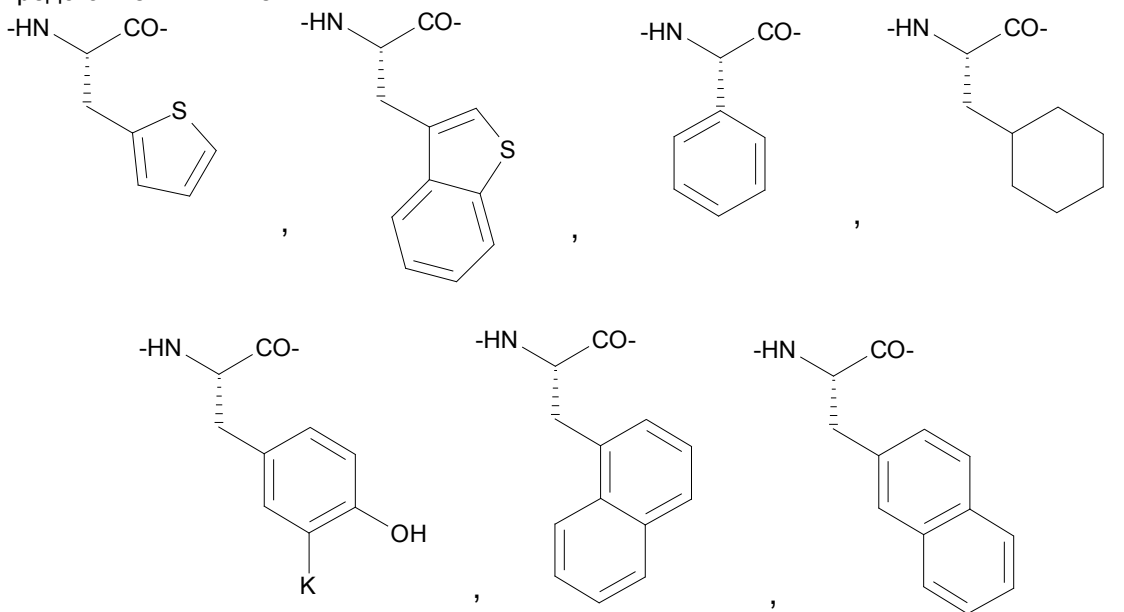
C-2: Хаа₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Хаа₂¹¹-His¹²-Leu ψ (CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃,

де:



10 Leu ψ (CHOH-CH₂)-(CH₂)₂-CH₃ являє собою

Хаа₁ являє собою D-Phe, D-Cpa, D-Tyr, D-Trp або залишок, що має будь-яку з формул, представлених нижче



К являє собою F, Cl, I або NO_2 ,

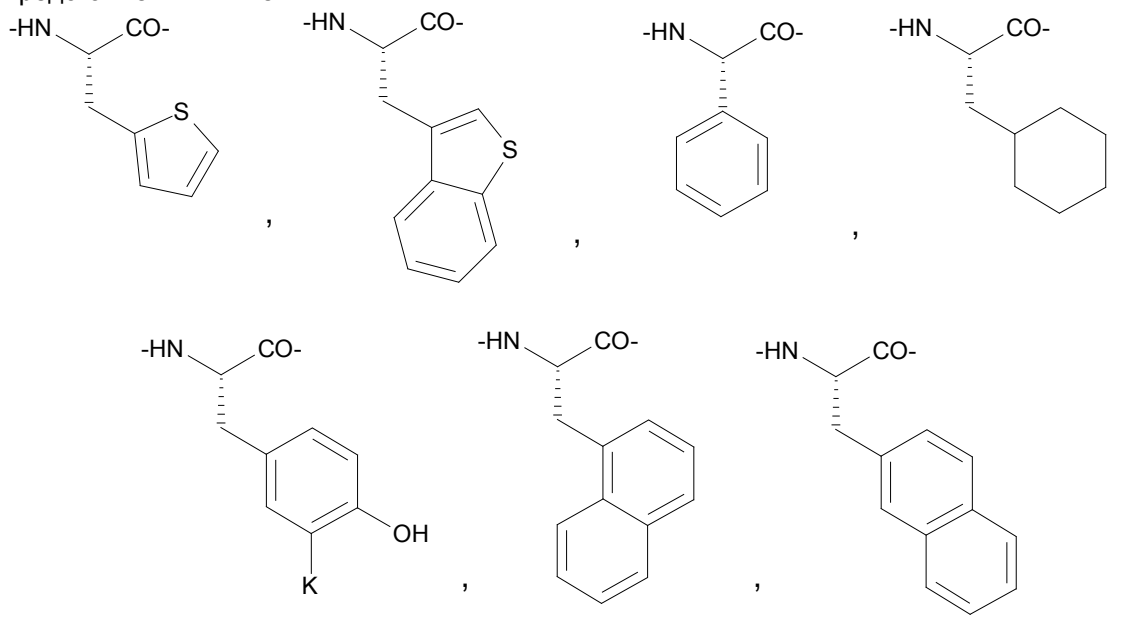
Хаа₂ являє собою Gly або β-A1a;

С-3: Хаа₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Хаа₂¹¹-His¹²-Хаа₅¹³-Хаа₆¹⁴-ZH,

де:

Хаа₁ являє собою D-Phe, D-Спа, D-Tyr, D-Trp або залишок, що має будь-яку з формул,

5



К являє собою F, Cl, I або NO₂,

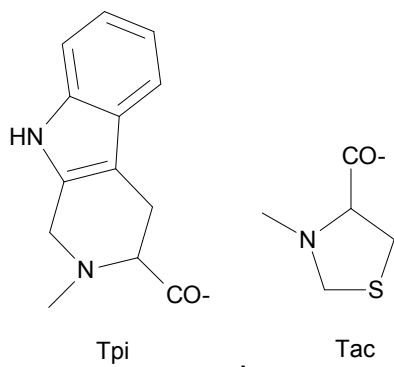
Хаа₂ являє собою Gly або β-A1a,

Хаа₅ являє собою Leuψ-CH₂NH-,

10

Хаа₆ являє собою Cys, Phe, Trp, Trp або Тас,

де Trp і Тас мають наступні значення:



i

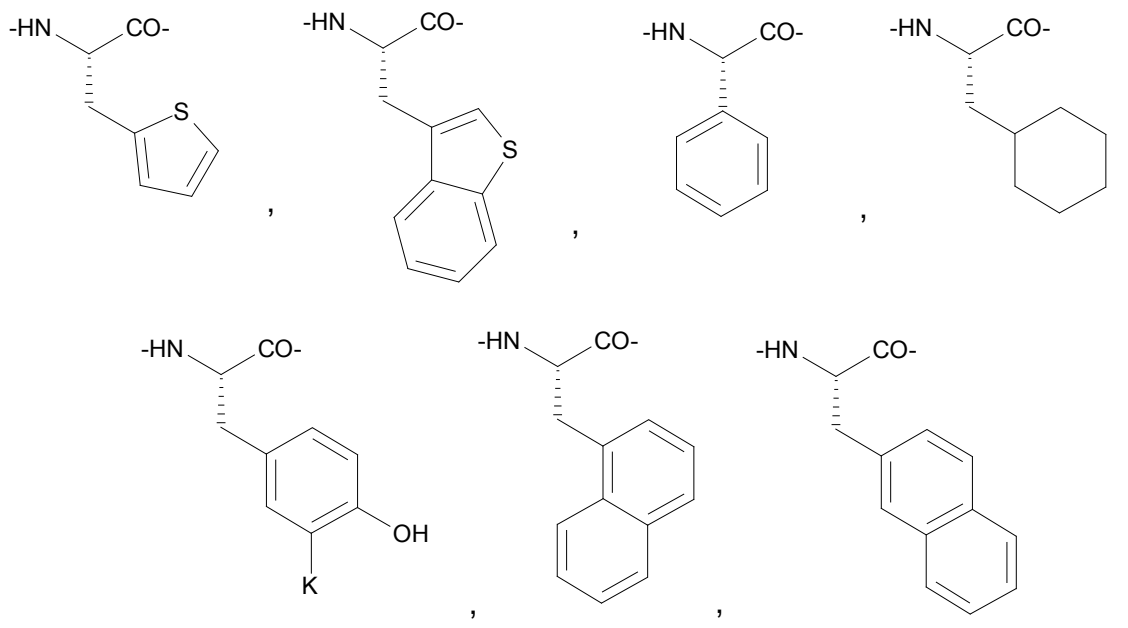
Z являє собою NH, або O;

15

С-4: Хаа₁⁶-Gln⁷-Trp⁸-Ala⁹-Val¹⁰-Хаа₂¹¹-His¹²-Хаа₇,

де:

Хаа₁ являє собою D-Phe, D-Спа, D-Tyr, D-Trp або залишок, що має будь-яку з формул, представлених нижче



K являє собою F, Cl, I, або NO₂,

Хаа₂ являє собою Gly або β-Ala,

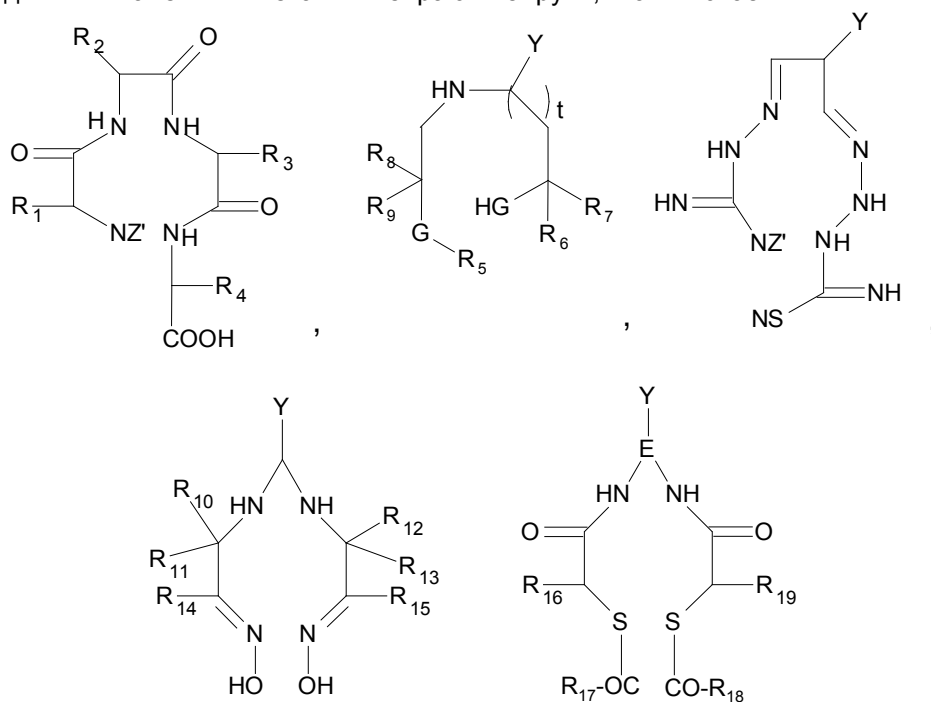
Хаа₇ являє собою Leu-O-алкіл,

і їх фармацевтично прийнятні солі неорганічних або органічних кислот, їх гідрати, комплекси, складні ефіри, аміди, сольвати й проліки.

2. Кон'югат антагоніста пептиду аналога бомбезину відповідно до п. 1, де хелатор металу (A) являє собою хелатор металу для тривалентних металів або для п'ятивалентних металів і їх близькі аналоги.

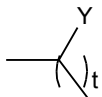
3. Кон'югат антагоніста пептиду аналога бомбезину відповідно до п. 2, де хелатор металу для тривалентних металів вибирають із групи, яка включає хелатори на основі DOTA, NOD ASA, NODAGA, NOTA, DTP A, EDTA, TETA і TRITA і їх близькі аналоги.

4. Кон'югат антагоніста пептиду аналога бомбезину відповідно до пункту 2, де хелатор металу для п'ятивалентних металів вибирають із групи, яка включає:

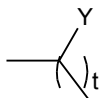


де

R_1 - R_{15} незалежно один від одного являють собою атоми водню або (C_1-C_4) -алкільні групи, де у



фрагменті вищенаведеної формули, t являє собою 1 або 2 або 3 і принаймні один з



атомів вуглецю у вказаному
фрагменті заміщений за допомогою Y або незаміщений за
допомогою Y ,

фрагменті заміщений за допомогою Y або незаміщений за

5 R_{16} являє собою атом водню або CO_2 (C_1-C_4) -алкільну групу;

R_{17} і R_{18} незалежно один від одного являють собою (C_1-C_4) -алкільні групи або фенільні групи;

R_{19} являє собою CH_2-COOH або його функціональне похідне;

E являє собою (C_1-C_4) -алкілен або фенілен

необов'язково (C_1-C_4) -алкілен, заміщений за допомогою CO_2 -алкілу, CH_2-CO -алкілу,

10 $CONH_2$ або $CONHCH_2-CO_2$ -алкілу,

необов'язково фенілен, заміщений за допомогою CO_2 -алкілу,

де алкільні групи мають від 1 до 4 атомів вуглецю;

G являє собою NH або S ;

Y являє собою функціональну групу, здатну зв'язуватися з вільною аміногрупою пептиду (N -кінця) або зі спейсером, і

15 Z' являє собою S або O .

5. Кон'югат антагоніста пептиду аналога бомбезину відповідно до п. 1, де радіонуклідний метал для візуалізації вибирають із групи, яка включає ^{133m}In , ^{99m}Tc , ^{67}Ga , ^{52}Fe , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{111}In , ^{97}Ru , ^{203}Pb , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{51}Cr , ^{52m}Mn , ^{157}Gd , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , та ^{82}Br .

20 6. Кон'югат антагоніста пептиду аналога бомбезину відповідно до п. 1, де радіонуклідний метал для променевої терапії вибирають із групи, яка включає ^{186}Re , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{69}Er , ^{121}Sn , ^{127}Te , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{161}Tb , ^{109}Pd , ^{188}Re , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{77}As , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{149}Pm , ^{151}Pm , ^{153}Sm , ^{159}Gd , ^{172}Tm , ^{90}Y , ^{111}In , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Lu , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{125}I , ^{123}I , ^{213}Bi , ^{225}Ac , ^{129}I та ^{177m}Sn .

25 7. Кон'югат антагоніста пептиду аналога бомбезину відповідно до п. 1, де спейсер B , зв'язаний з N -кінцем C , має загальну формулу II:

II B_1-B_2 ,

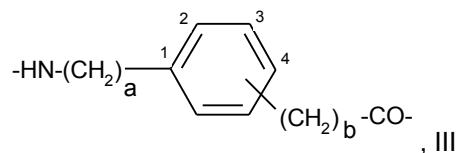
де

B_1 являє собою ковалентний зв'язок або амінокислоту, яка зустрічається в природі, або амінокислоту, яка не зустрічається в природі, або лінійний діамін або циклічний діамін,

30 B_2 являє собою ковалентний зв'язок або амінокислоту, яка зустрічається в природі, або амінокислоту, яка не зустрічається в природі, або лінійну карбонову кислоту або циклічну карбонову кислоту,

за умови, що обидва B_1 і B_2 не можуть одночасно являти собою ковалентні зв'язки й, що коли B_1 являє собою діамін, то B_2 являє собою карбонову кислоту.

35 8. Кон'югат антагоніст пептид аналог бомбезину відповідно до п. 7, де амінокислота, яка не зустрічається в природі, являє собою сполуку, яка має будь-яку із загальних формул III, IV, V або VI, де

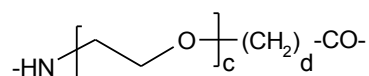


де

40 a являє собою ціле число від 0 до 3,

b являє собою ціле число від 0 до 3,

і відносні схеми заміщення або необов'язково 1,2-, 1,3- або 1,4-;

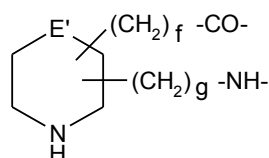


, IV

45 де

c являє собою ціле число від 1 до 24,

d являє собою ціле число від 1 до 6;



, V

де

E' являє собою NH, або CH₂,

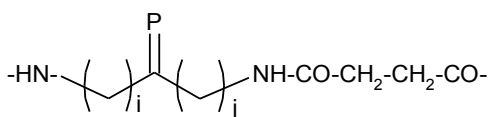
f являє собою ціле число від 0 до 6,

5 g являє собою ціле число від 0 до 6;

коли E' являє собою CH₂ до 6-членне кільце необов'язково заміщене в будь-якому положенні вуглецю 6-членного кільця на тому ж самому вуглеці кільця або на різних вуглецях,

коли E' являє собою NH, то 6-членне кільце необов'язково заміщене в будь-якому положенні вуглецю 6-членного кільця на тому ж самому атомі вуглецю кільця або на різних атомах

10 вуглецю та/або на атомі азоту за умови, що f або g являє собою ціле число, рівне або більше 1;



, VI

де

i являє собою ціле число від 1 до 6,

15 j являє собою ціле число від 1 до 6,

P являє собою O або H₂,

переважно,

i являє собою ціле число від 1 до 3,

j являє собою ціле число від 1 до 3,

20 P являє собою O, і їх близькі аналоги.

9. Кон'югат антагоніста пептиду аналога бомбезину відповідно до будь-якого з пп. 1-8, за умови, що кон'югат антагоніста пептиду аналога бомбезину має загальну формулу (I')

(I') [A'-(B)_n]_x-C,

де

25 A' включений замість A і має такі ж значення, як і A, за винятком того, що він являє собою хелатор металу без радіонуклідного металу.

10. Фармацевтична композиція, яка містить будь-які з кон'югатів антагоніста пептиду аналога бомбезину відповідно до будь-якого з пп. 1-9.

30 11. Застосування будь-якого з кон'югатів антагоніста пептиду аналога бомбезину відповідно до будь-якого з пунктів 1-9 при раку передміхурової залози для зв'язування з рецепторами бомбезину, переважно з рецептором пептиду, що вивільняє гастрин (GRP), та/або для інгібування рецепторів бомбезину, переважно рецептора пептиду, що вивільняє гастрин (GRP).

12. Спосіб приготування будь-якого з кон'югатів антагоніста пептиду аналога бомбезину відповідно до п. 1,

35 який включає стадію

радіоактивне хелатування кон'югата антагоніста пептиду аналога бомбезину, який має загальну формулу (I'), як визначено вище, з підходящим радіонуклідним металом або атомом металу.

13. Спосіб візуалізації рецепторів бомбезину, переважно пухлинних клітин, які експресують GRP рецептор, та/або пухлинних і перипухлинних судин, у пацієнта, який включає стадії:

40 введення пацієнтові радіофармацевтично ефективної кількості кон'югата антагоніста пептиду аналога бомбезину відповідно до будь-якого з пп. 1-8;

візуалізацію радіонуклідного металу в пацієнта.

14. Застосування радіофармацевтично ефективної кількості кон'югата антагоніста пептиду аналога бомбезину відповідно до будь-якого з пунктів 1-8 для приготування візуалізуючого засобу для візуалізації рецепторів бомбезину, переважно пухлинних клітин, які експресують GRP рецептор, та/або пухлинних і перипухлинних судин.

45 15. Застосування відповідно до пункту 14, де вказані пухлинні клітини стосуються злоякісних новоутворень, які вибирають із групи, яка включає:

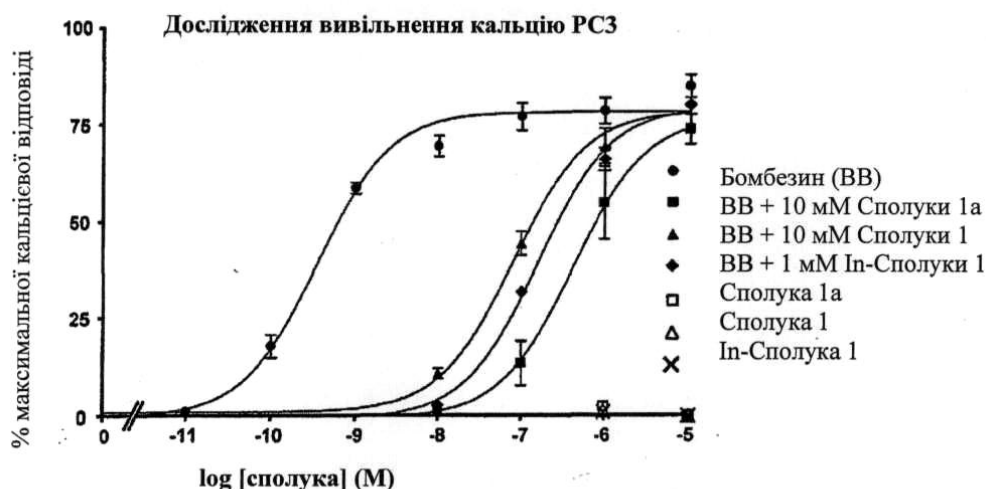
рак передміхурової залози, включаючи метастази,

50 рак молочної залози, включаючи метастази,

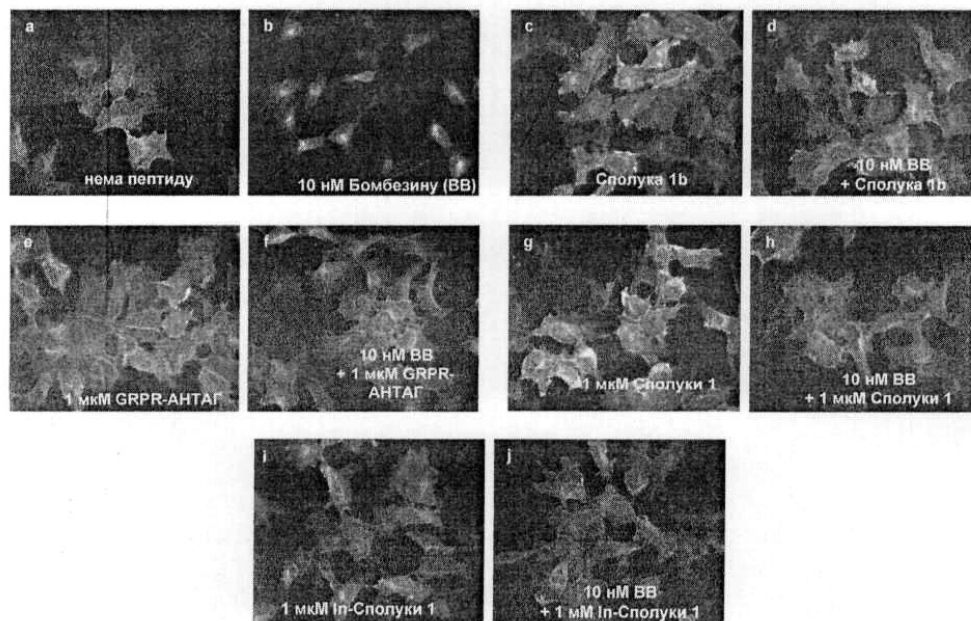
шлунково-кишкові стромальні пухлини,

дрібноклітинний рак легені,

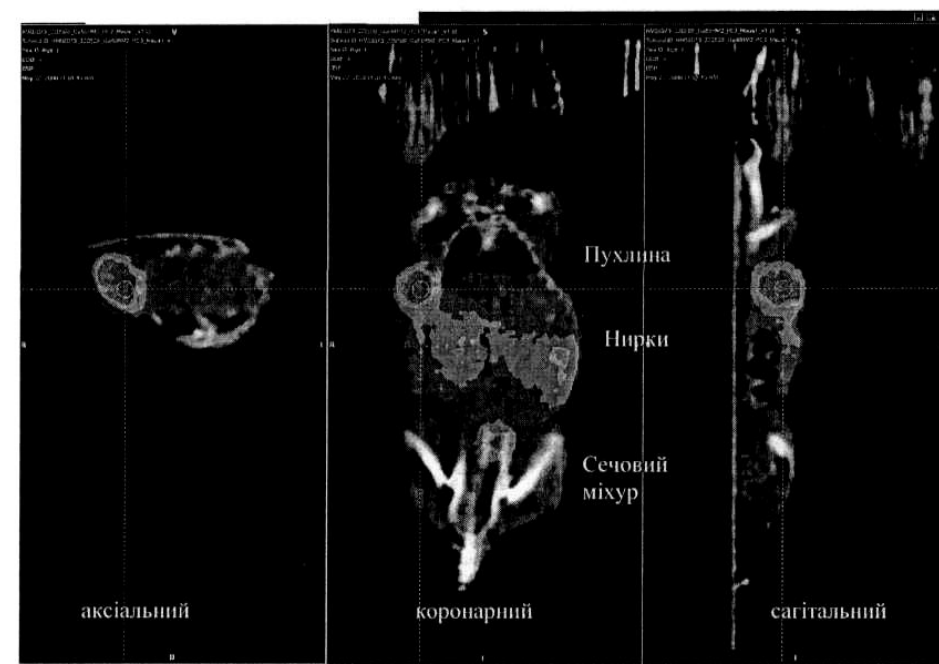
- нирковоклітинний рак,
нейроендокринні пухлини шлунково-кишкового тракту й підшлункової залози,
плоскоклітинний рак голови й шиї,
нейробластоми, і
- 5 плоскоклітинний рак стравоходу і, де
вказані пухлинні й перипухлинні судини стосуються злоякісних новоутворень, які
вибирають із групи, яка включає:
рак яєчників,
рак ендометрію, і
- 10 рак підшлункової залози.
16. Спосіб лікування або запобігання захворювань, зв'язаних з пухлинними клітинами та/або
пухлинними й перипухлинними судинами, який включає стадію:
введення терапевтично ефективної кількості кон'югата антагоніста пептиду аналога бомбезину
відповідно до будь-якого з пп. 1-8.
- 15 17. Застосування терапевтично ефективної кількості кон'югата антагоніста пептиду аналога
бомбезину відповідно до будь-якого з пп. 1-8 для приготування лікарського засобу для лікування
або запобігання захворювань, зв'язаних з пухлинними клітинами та/або пухлинними й
перипухлинними судинами.
18. Застосування відповідно до п. 17, де вказані захворювання, зв'язані з пухлинними клітинами,
вибирають із групи, яка включає:
рак передміхурової залози, включаючи метастази,
рак молочної залози, включаючи метастази,
шлунково-кишкові стромальні пухлини,
дрібноклітинний рак легені,
- 20 нирковоклітинний рак,
нейроендокринні пухлини шлунково-кишкового тракту й підшлункової залози,
плоскоклітинний рак голови й шиї,
нейробластоми, і
- 25 плоскоклітинний рак стравоходу і, де
вказані захворювання, зв'язані з пухлинними й перипухлинними судинами, вибирають із групи,
яка включає:
рак передміхурової залози, включаючи метастази, і
рак молочної залози, включаючи метастази.
- 30 19. Набір для препарату радіотерапевтичного засобу або радіофармацевтичного візуалізуючого
засобу, який включає флакон, що містить заздалегідь визначену кількість кон'югата антагоніста
пептиду аналога бомбезину відповідно до п. 9 і прийнятний носій, розріджувач, наповнювач або
ад'ювант для мічення хелатору металу радіоактивним ізотопом.



Фігура 1



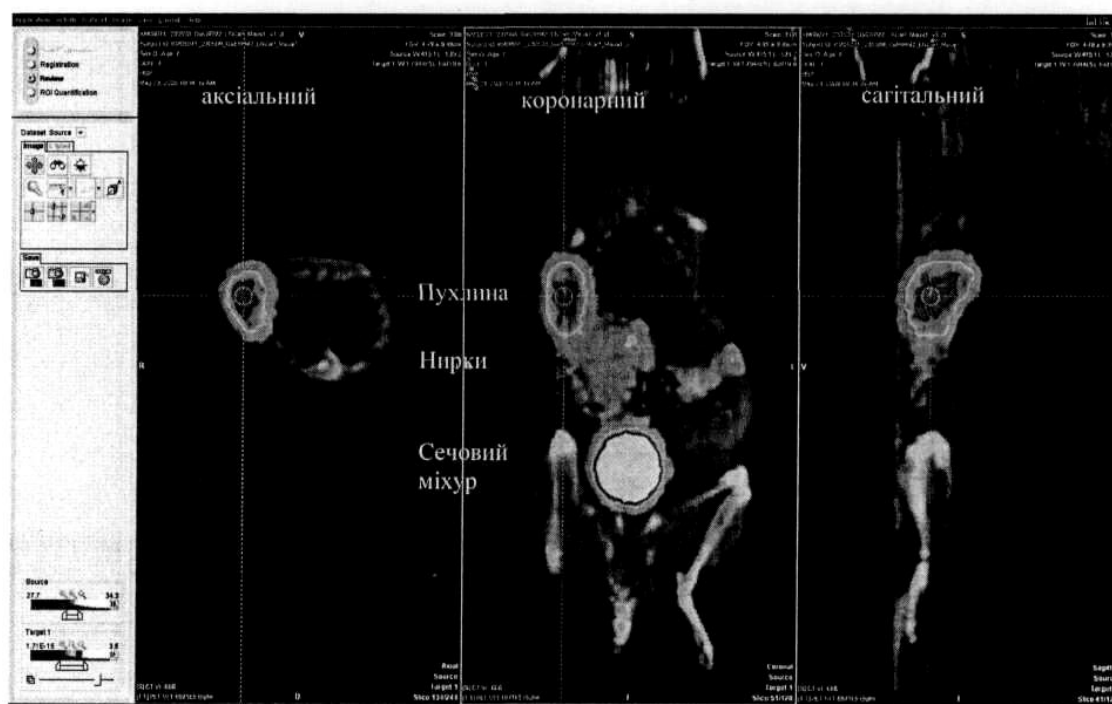
Фігура 2



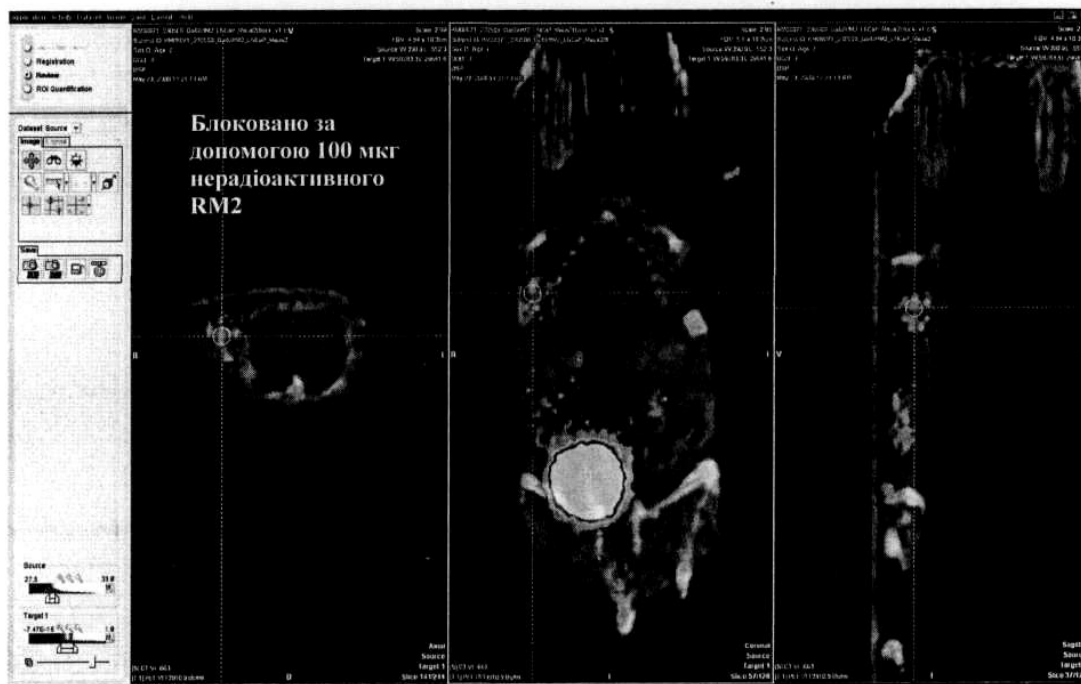
Фігура 3а



Фігура 3b



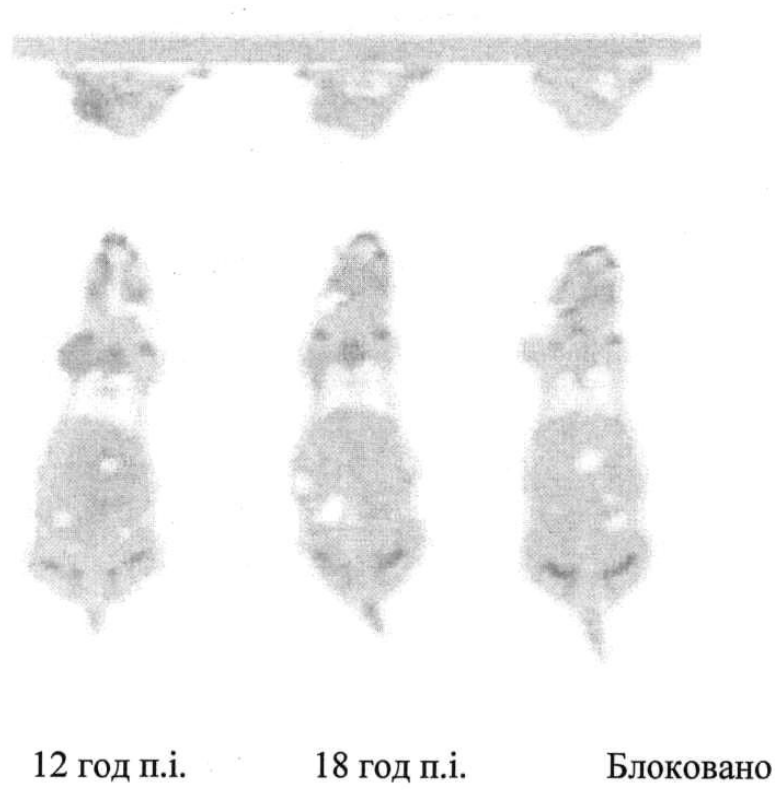
Фігура 4a



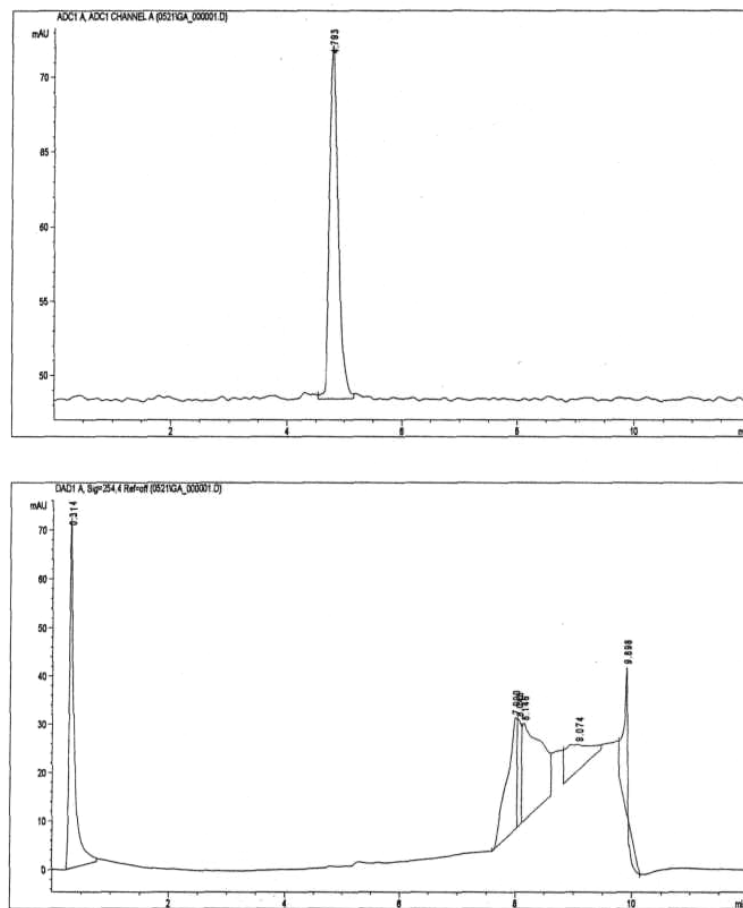
Фігура 4b



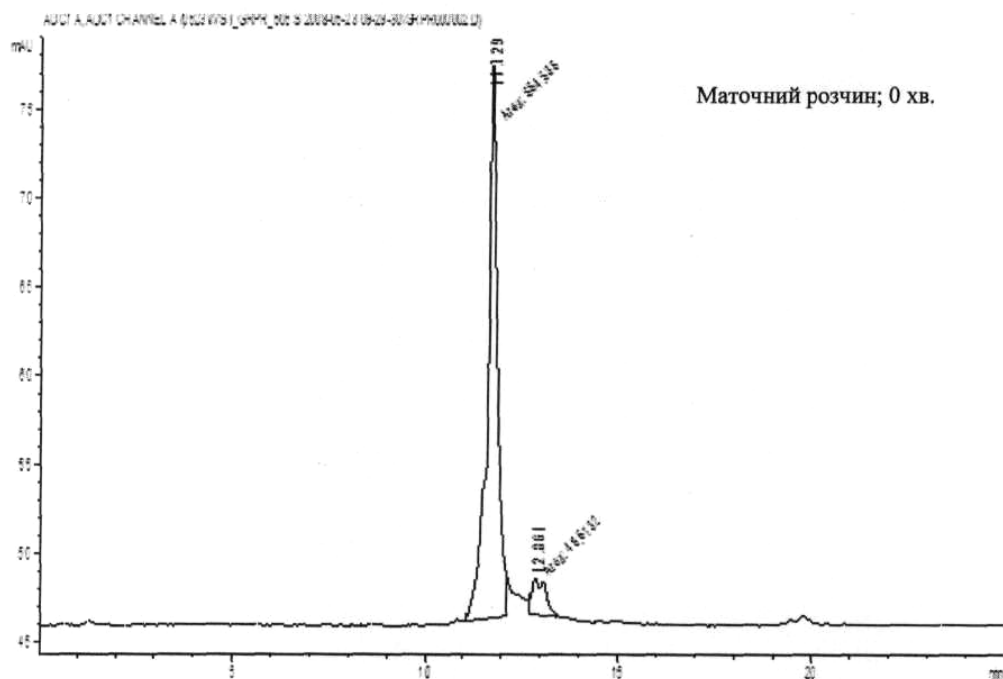
Фігура 6



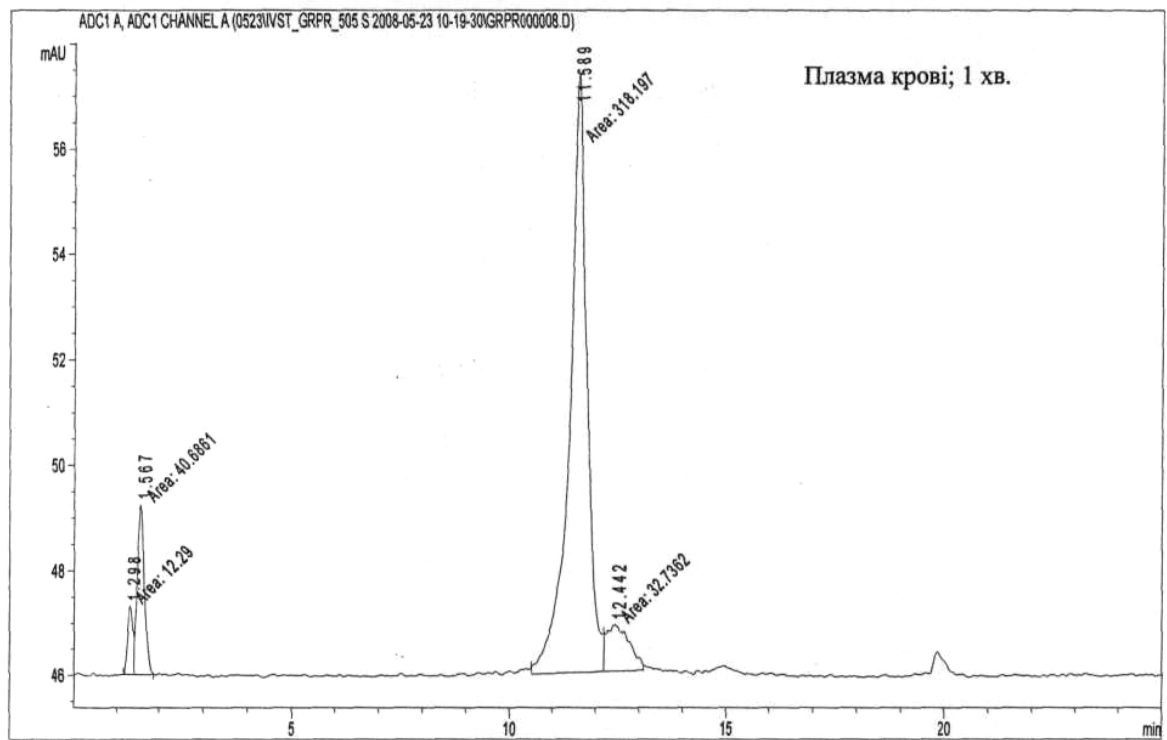
Фігура 8



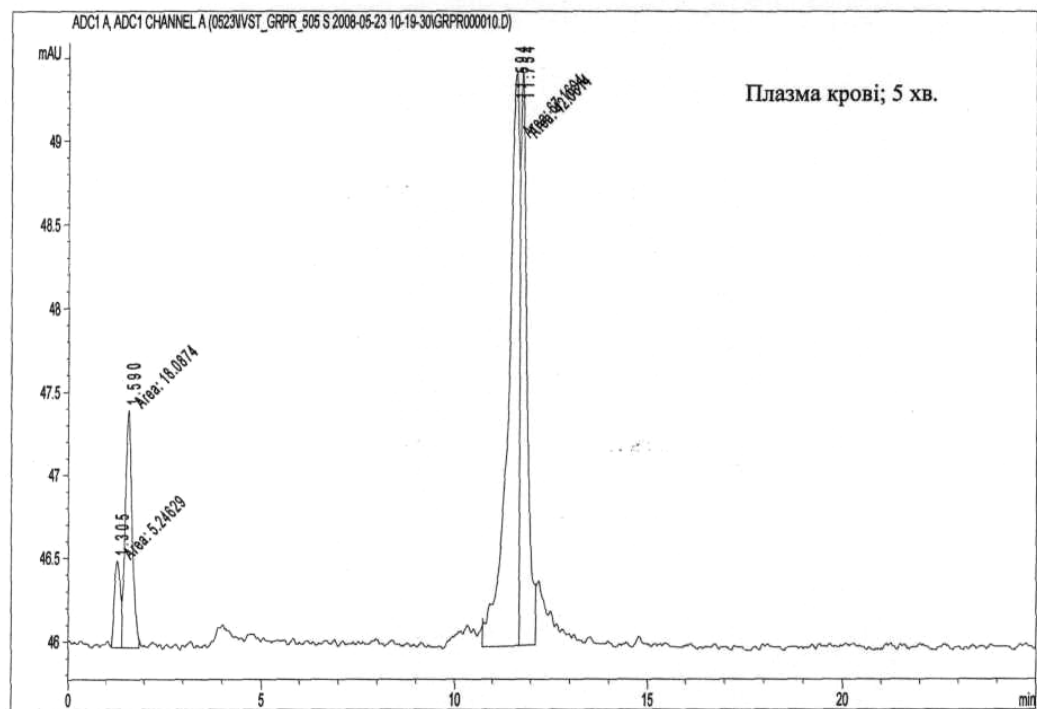
Фігура 9



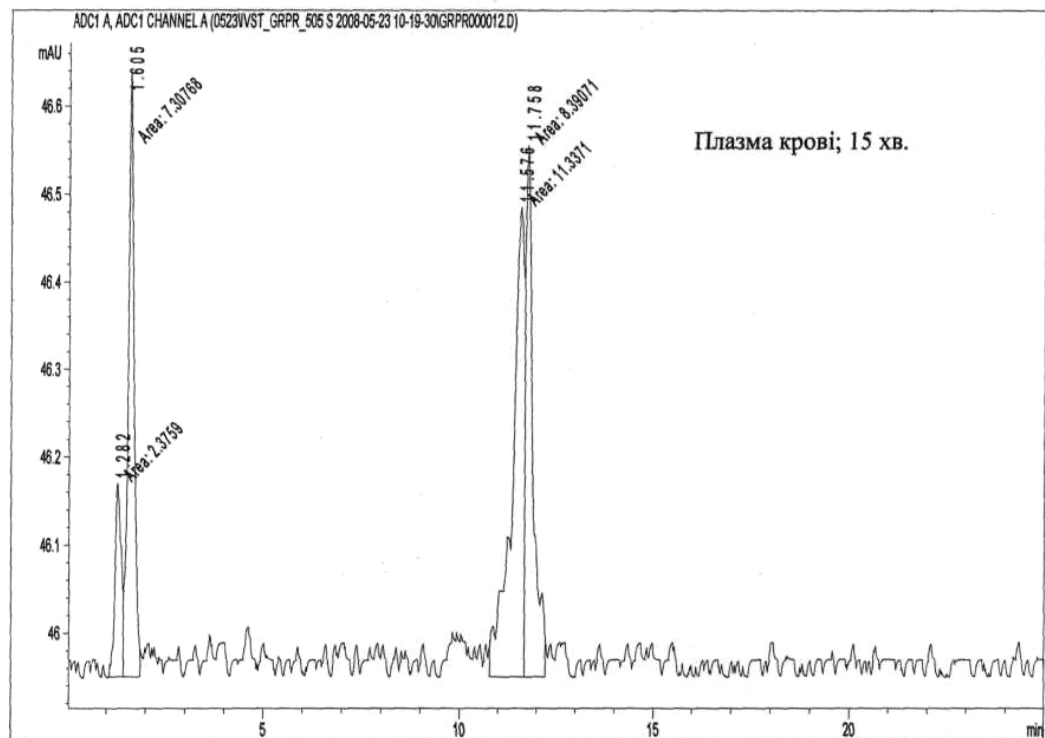
Фігура 10а



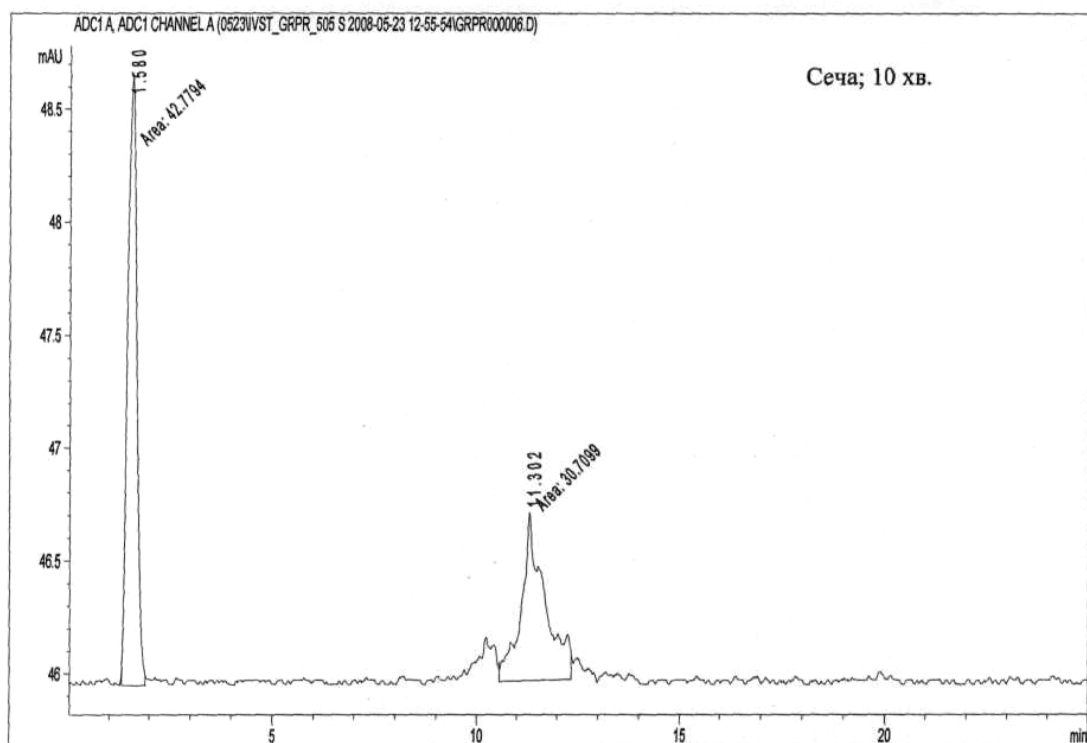
Фігура 10b



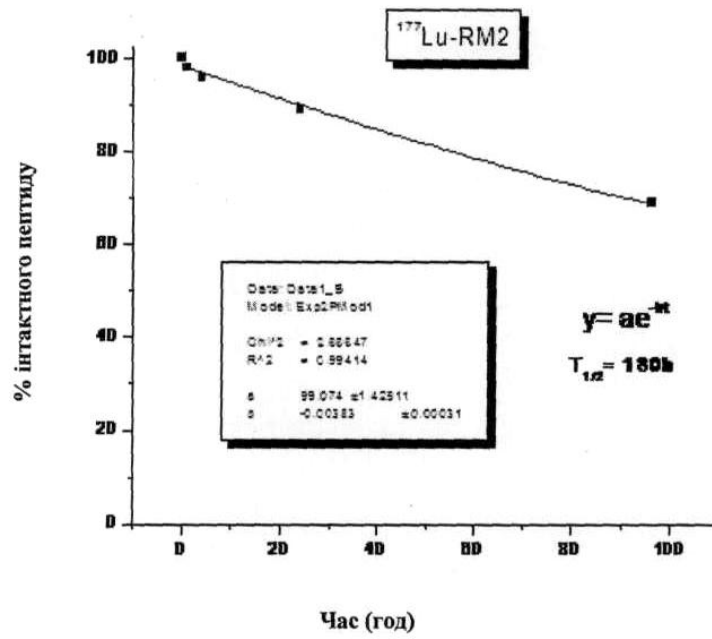
Фігура 10c



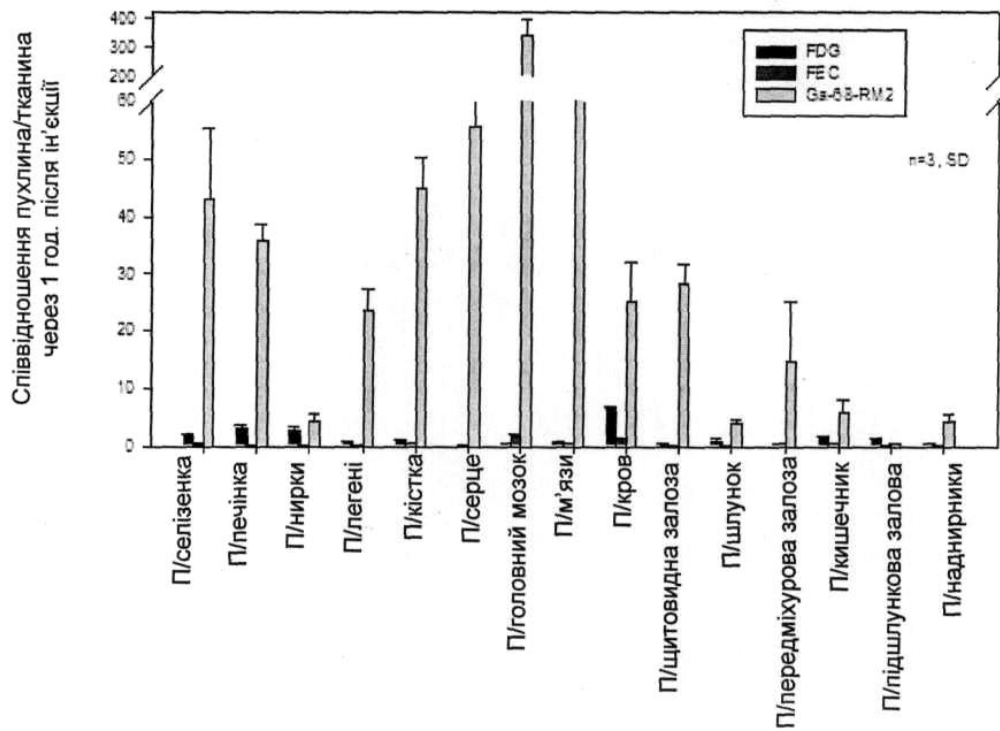
Фігура 10d



Фігура 10e



Фігура 11



Фігура 12

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601