РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 693 465**(13) **C9**

(51) МПК
A61K 51/08 (2006.01)
C07B 59/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) СКОРРЕКТИРОВАННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Примечание: библиография отражает состояние при переиздании

(52) СПК
A61K 51/08 (2019.02); A61P 35/00 (2019.02); C07B 59/00 (2019.02)

(21)(22) Заявка: **2015115529, 25.09.2013**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.09.2013

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
25.09.2012 US 61/705,513

(43) Дата публикации заявки: **20.11.2016** Бюл. № **32**

(45) Опубликовано: **03.07.2019**

(15) Информация о коррекции:
Версия коррекции №1 (W1 C2)

(48) Коррекция опубликована:
14.08.2020 Бюл. № 23

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **27.04.2015**

(86) Заявка PCT:
US 2013/061712 (25.09.2013)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2014/052471 (03.04.2014)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры"

(72) Автор(ы):
МАИНА-НОК Теодосия (GR),
НОК Бертхольд Артур (GR),
ДЕ ЙОНГ ХЕНДРИКС Марион (NL)

(73) Патентообладатель(и):
ЭДВАНСТ ЭКСЕЛЕРЕЙТЕР ЭПЛИКЕЙШНС ЮЭсЭй, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **ABD-ELGALIEL W R ET AL., "Design, synthesis, and biological evaluation of an antagonist-bombesin analogue as targeting vecto", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, ACS, WASHINGTON, DC, US, 2008, vol. 19, no. 10, pages 2040-2048. US 5019647 A, 28.05.1991. DAVID C. HEIMBROOK ET AL., "Gastrin releasing peptide antagonists with improved potency and stability",** (см. прод.)

(54) АНТАГОНИСТЫ GRPR ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ, ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ GRPR-ПОЗИТИВНОГО ОНКОЛОГИЧЕСКОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине, а именно к онкологии, и может быть использована для лечения рака, экспрессирующего рецептор гастриновысвобождающего пептида (GRPR). Предложена фармацевтическая композиция, содержащая антагонист GRPR, содержащий радиоактивную метку общей формулы: MC-S-P и терапевтически приемлемый эксципиент. Также предложены фармацевтическая композиция для обнаружения, визуализации, диагностики и/или нацеливания на рак, экспрессирующий рецептор гастриновысвобождающего пептида, способ обнаружения, визуализации, диагностики, нацеливания и лечения рака экспрессирующего GRPR, соединения NeoBOMB-1 и NeoBOMB-2. Группа изобретений обеспечивает диагностику и

RU 2693465 C9

лечение указанного рака у субъекта. 10 н. и 10 з.п. ф-лы, 2 ил.

(56) (продолжение):
JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, 1991, vol. 34, no. 7, pages 2102-2107. SAFAVY ET AL., Synthesis of bombesin analogs for radiolabeling with rhenium-188 // CANCER, AMERICAN CANCER SOCIETY, PHILADELPHIA, PA, US, 1997, vol. 80, no. 12, pages 2354-2359.

RU 2693465 C9

RU 2693465 C9

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 693 465**(13) **C9**

(51) Int. Cl.
A61K 51/08 (2006.01)
C07B 59/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

Note: Bibliography reflects the latest situation

(52) CPC
***A61K 51/08** (2019.02); **A61P 35/00** (2019.02); **C07B 59/00** (2019.02)*

(21)(22) Application: **2015115529, 25.09.2013**

(24) Effective date for property rights:
25.09.2013

Priority:
(30) Convention priority:
25.09.2012 US 61/705,513

(43) Application published: **20.11.2016** Bull. № **32**

(45) Date of publication: **03.07.2019**

(15) Correction information:
Corrected version no1 (W1 C2)

(48) Corrigendum issued on:
14.08.2020 Bull. № 23

(85) Commencement of national phase: **27.04.2015**

(86) PCT application:
US 2013/061712 (25.09.2013)

(87) PCT publication:
WO 2014/052471 (03.04.2014)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):
MAINA-NOK Teodosiya (GR),
NOK Bertkhold Artur (GR),
DE JONG KHENDRIKS Marion (NL)

(73) Proprietor(s):
EDVANST EKSELEREJTER EPLIKEJSHNS YUEsEj, INK. (US)

(54) **GRPR ANTAGONISTS FOR DETECTING, DIAGNOSING AND TREATING GRPR-POSITIVE ONCOLOGICAL DISEASE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions refers to medicine, namely to oncology, and can be used for treating cancer, which expresses gastrin releasing peptide (GRPR) receptor. Disclosed is a pharmaceutical composition containing a GRPR antagonist containing a radioactive label of general formula: MC-S-P and a therapeutically acceptable excipient. Also disclosed are a pharmaceutical composition for detecting, visualizing, diagnosing and / or targeting cancer expressing a gastrin releasing peptide receptor, a method of detecting, visualizing, diagnosing, targeting and treating cancer of expressing GRPR, compound NeoBOMB-1 and NeoBOMB-2.

EFFECT: group of inventions provides diagnosing and treating said cancer in a subject.

20 cl, 2 dwg

RU 2693465 C9

RU 2693465 C9

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

В настоящей заявке заявляется приоритет предварительной заявки на патент США № 61/705513, поданной 25 сентября 2012, которая включена в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Было показано, что раковые клетки экспрессируют разнообразные специфические биомолекулы, такие как пептидные рецепторы, которые могут служить в качестве участков распознавания для широкого круга циркулирующих векторов, например, пептидных лигандов. В том случае, когда экспрессия мишени-рецептора выше на злокачественных клетках, чем в окружающей здоровой ткани, возникает возможность использовать взаимодействие между указанными двумя молекулярными структурами. Для диагностической визуализации или нацеленных терапевтических применений природные пептидные лиганды могут быть модифицированы таким образом, чтобы стабильно связывать диагностический или терапевтический радионуклид, например, атом радиоактивного металла или атом радиоактивного галогена.

Во многих случаях бифункциональный хелатообразующий агент ковалентно присоединен посредством карбоксильной группы к N-концевой аминогруппе пептидного лиганда с образованием пептидной связи. С целью увеличения биологической устойчивости, гидрофильности, аффинности связывания рецептора и/или эффективности интернализации предпринимались попытки дальнейшей модификации нативных лигандов рецепторов, например, путем замены ключевых аминокислот в пептидной цепи. В качестве альтернативы, включение подходящих разделительных групп между хелатообразующим агентом и участком распознавания пептидного рецептора или гетеро/гомопептидная мультимеризация в равной степени могут привести к улучшению многих биологических параметров, которые, в конечном счете, улучшают в целом фармакокинетику и кумуляцию мишени радиоактивного зонда.

Полученный пептид-хелатный конъюгат после нанесения метки с помощью диагностических или терапевтических радионуклидов (радиопептидов) вводят пациенту. Радиопептид избирательно накапливается на раковых участках за счет специфического взаимодействия с молекулой-мишенью, в частности, с родственным пептидным рецептором, который в высокой степени экспрессируется на опухоли. В случае диагностического радионуклида опухоли и метастазы затем локализуются путем визуализации участка (участков), где происходит радиоактивный распад, с помощью внешнего устройства формирования изображения. Когда в пептид-хелатный конъюгат внесена метка терапевтического радионуклида, радиотоксичная нагрузка доставляется специфично в первичную опухоль и ее метастазы. Терапевтический радионуклид затем распадается на участках злокачественных новообразований, высвобождая корпускулярную энергию, что приводит к уничтожению опухолевых очагов или сокращению их роста.

Указанную стратегию элегантно использовали для соматостатина и его рецепторов. Последние в высокой степени экспрессируются в различных опухолях человека, в особенности в нейроэндокринных опухолях (NET). За внедрением в клиническую практику OctreoScan® ([^{111}In-DTPA]октреотида), позволившего провести успешную диагностическую визуализацию NET, вскоре последовали многие новые улучшенные аналоги соматостатина, содержащие метку широкого круга пригодных для использования в медицине радиоактивных металлов, которые могут применяться не только для обычной визуализации с помощью гамма-камеры, но и для PET и, самое главное, для радионуклидной терапии. Проводимые клинические испытания показали

терапевтическую эффективность указанных новых радиопептидов.

Пептидные рецепторы и их лиганды являются привлекательными молекулярными инструментами в диагностике и лечении онкологических заболеваний. Например, высокий уровень экспрессии рецепторов гастриновысвобождающего пептида (GRPR) зарегистрирован в нескольких часто встречающихся опухолях человека, таких как рак предстательной железы, рак молочной железы и рак легких. Как следствие, в последнее время повысилась значимость GRPR в качестве предпочтительных молекулярных мишеней для содержащих радиоактивную метку бомбезиноподобных пептидов с целью повышения диагностического и терапевтического арсенала ядерной онкологии.

Бомбезин (BBN) представляет собой тетрадекапептид, первоначально выделенный из кожи европейской лягушки Bombina bombina. Бомбезин и родственные ему пептиды влияют на терморегуляцию и усвоение пищи после связывания со специфическими рецепторами в организме людей. Указанные рецепторы включают три подтипа, встречающиеся у млекопитающих, а именно, рецептор нейромедина B (NMBR или BB_1R), обладающий высоким сродством к NMB, GRPR (или BB_2R), обладающий высоким сродством к GRP, и BB_3R, представляющий собой рецептор-сироту, лиганд для которого пока еще не определен. BBN земноводных с высоким сродством связывается с подтипами NMBR и GRPR. NMB и GRP являются аналогами млекопитающих для BBN земноводных, и все они имеют родственную структуру.

Большинство содержащих радиоактивную метку BBN-подобных пептидов, разработанных для молекулярной визуализации и радионуклидной терапии опухолей человека, основаны на природном BBN или на его C-концевом октапептидном фрагменте, который все еще в состоянии связывать GRPR. Указанные аналоги, модифицированные, как описано выше, как правило, проявляют агонистические свойства и после связывания с GRPR интернализуются во внутриклеточной области злокачественных клеток. Это свойство приводит к высокому аккумулированию радиоактивной метки в $GRPR^+$ опухолевых очагах и тем самым повышает либо диагностическую чувствительность, либо терапевтическую эффективность.

К сожалению, BBN-подобные пептиды являются действенными агонистами GRPR и вызывают нежелательные эффекты, связанные с желудочно-кишечной подвижностью и терморегуляцией, когда их внутривенно (iv) вводят человеку даже в небольших количествах. Кроме того, BBN-подобные пептиды обладают митогенными свойствами. Вышеуказанные свойства ограничивают тщательную клиническую валидацию и/или, в конечном счете, коммерческое использование нескольких перспективных агонистов на основе содержащих радиоактивную метку бомбезинов. Сказанное особенно актуально в случае целенаправленной радионуклидной терапии, где пациентам необходимо назначать внутривенно большие количества пептидов.

В отличие от содержащих радиоактивную метку агонистов BBN, содержащие радиоактивную метку агонисты соматостатина, которые одинаково хорошо интернализуются в злокачественных клетках, экспрессирующих рецептор соматостатина, не вызывают после внутривенной инъекции нежелательные физиологические эффекты в организме человека. Этот факт способствовал расширенной и систематической клинической валидации нескольких перспективных содержащих радиоактивную метку соматостатинов даже в области радионуклидной терапии опухолей.

Известно радиофармацевтическое средство ([^{99m}Tc]-демобезин 1, [^{99m}Tc-N_4']-DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-NHEt), и оно используется для мышей, имеющих ксенотрансплантаты рака предстательной железы человека PC-3, где [^{99m}Tc]-демобезин

1 продемонстрировал выдающиеся фармакокинетические свойства по сравнению с аналогичными аффинными агонистами на основе бомбезина, такими как, например, [^{99m}Tc]-демобезин 3-6. Помимо его значительно более высокого накопления в опухоли, [^{99m}Tc]-демобезин 1 очень быстро выводится из организма мышей и поджелудочной железы, в высокой степени GRPR-позитивного органа.

Хотя первые исследования на ограниченном количестве больных с раком предстательной железы подтвердили отличную переносимость радиофармацевтического препарата, они показали неоптимальный фармакокинетический профиль для людей, который препятствует дальнейшему расширению клинического применения данного препарата в качестве диагностического инструмента визуализации. В частности, [^{99m}Tc] -демобезин 1, несмотря на его быстрое выведение из организма и из поджелудочной железы и на его довольно высокую стабильность в условиях in vivo, демонстрирует недостаточное удерживание в злокачественных новообразованиях у человека по сравнению с содержащими радиоактивную метку BBN-подобными агонистами. Кроме того, [^{99m}Tc]-демобезин 1 был разработан для диагностической визуализации с использованием обычной гамма-камеры или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (SPECT) и непригоден для позитронно-эмиссионной томографии (PET) или приложений радионуклидной терапии. Хотя внесение метки с помощью применяемого для PET радионуклида ^{94m}Tc возможно при использовании ациклической N_4-системы, применение этого радионуклида в медицине ограничено как вследствие неоптимальных ядерных характеристик, так и трудностей с его получением. С другой стороны, терапевтические возможности ограничиваются $^{186/188}$Re, поскольку N_4-хелатообразующий агент не может стабильно связывать большинство двух- и трехвалентных радиоактивных металлов, используемых в ядерной медицине.

Таким образом, объектом настоящего изобретения является высокая степень захвата и удерживания диагностической и терапевтической радиоактивной метки селективно по отношению как к первичному, так и метастатическому $GRPR^+$ онкологическому заболеванию.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к зондам для использования с целью обнаружения, визуализации, диагностики, нацеливания, лечения и т.д. онкологических заболеваний, экспрессирующих рецептор гастриновысвобождающего пептида (GRPR). Подобные зонды могут представлять собой молекулы, конъюгированные с детектируемыми метками, которые, предпочтительно, представляют собой химические соединения, пригодные для обнаружения путем гамма-визуализации и SPECT или с помощью позитронно-эмиссионной томографии (PET), или магнитно-резонансной томографии (MRI), или флуоресцентной спектроскопии, или оптических методов визуализации. Подобные зонды также могут представлять собой молекулы, конъюгированные с противораковыми препаратами или фрагментами, включающими терапевтический радионуклид, и способны доставить цитотоксическую нагрузку, такую как цитотоксическое лекарственное средство или терапевтический радионуклид, в участок (участки) болезни.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения касаются антагониста GRPR общей формулы:

MC-S-P,

где:

- по меньшей мере, один (радиоактивный) атом металла (M) и хелатирующий агент (C), который устойчиво связывает M; в качестве альтернативы, MC может обозначать Tyr- или простетическую группу, несущую (радиоактивный) атом галогена.

S обозначает необязательную разделительную группу, расположенную между N-концом P и C и присоединенную к ним ковалентными связями, которая может быть выбрана таким образом, чтобы обеспечить условия для введения (радиоактивного) атома галогена;

P обозначает антагонист пептидного рецептора GRP общей формулы:

Xaa_1-Xaa_2-Xaa_3-Xaa_4-Xaa_5-Xaa_6-Xaa_7-Z,

Xaa_1 отсутствует или выбран из группы, включающей аминокислотные остатки Asn, Thr, Phe, 3-(2-тиенил)аланин (Thi), 4-хлорфенилаланин (Cpa), α-нафтилаланин (α-Nal), β-нафтилаланин (β-Nal), 1,2,3,4-тетрагидроноргарман-3-карбоновую кислоту (Tpi), Tyr, 3-иод-тирозин (o-I-Tyr), Trp, пентафторфенилаланин (5-F-Phe) (все в виде L- или D-изомеров);

Xaa_2 обозначает Gln, Asn, His;

Xaa_3 обозначает Trp, 1,2,3,4-тетрагидроноргарман-3-карбоновую кислоту (Tpi);

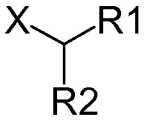
Xaa_4 обозначает Ala, Ser, Val;

Xaa_5 обозначает Val, Ser, Thr;

Xaa_6 обозначает Gly, саркозин (Sar), D-Ala, β-Ala;

Xaa_7 обозначает His, (3-метил)гистидин (3-Me)His;

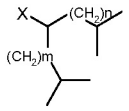
Z выбран из -NHOH, -$NHNH_2$, -NH-алкила, -N(алкил)$_2$ или -O-алкила, или



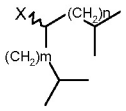
,

где X представляет собой NH (амид) или O (сложный эфир), а R1 и R2 могут быть одинаковыми или различными и выбраны из протона, (замещенного) алкила, (замещенного) алкилового эфира, арила, арилового эфира или алкил-, галоген-, гидроксил- или гидроксиалкилзамещенной ароматической группы.

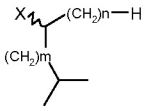
В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения агонист GRPR по настоящему изобретению представляет собой вышеописанное соединение, где Z, предпочтительно, выбран из одной из следующих формул, где X обозначает NH или O:



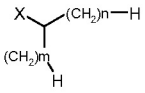
m = n = 0, 1, 2, 3



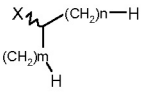
m # n = 0, 1, 2, 3



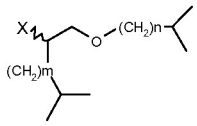
m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2, ...9



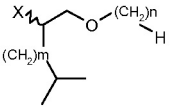
m = n = 0, 1, 2,...9



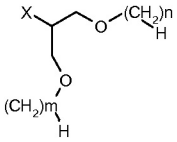
m # n = 0, 1, 2,...9



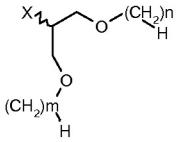
m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2, ...5



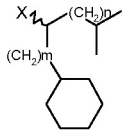
m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2, ...7



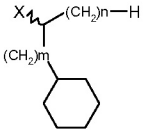
m = n = 1, 2, 3,...7



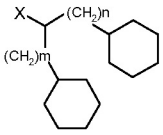
m # n = 1, 2, 3,...7



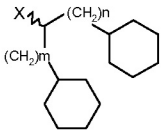
m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...7



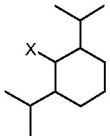
m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...9

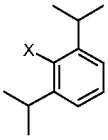


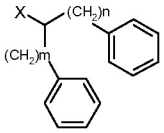
m = n = 0, 1, 2, 3



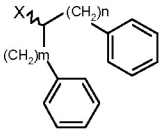
m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...9



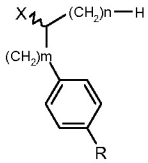




m = n = 0, 1, 2, 3

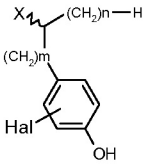


m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...9



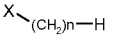
R = H, Cl, Br, I

m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...9

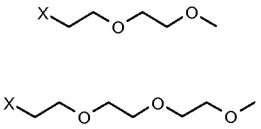


Hal = Cl, Br, I

m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...9



n = 1, 2, 3,...10



Кроме того, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения агонист GRPR представляет собой вышеуказанное соединение, где R1 такой же, как и R2.

В некоторых из любых вышеуказанных вариантов его осуществления настоящее изобретение относится к соединениям, где P выбран из группы, включающей:

DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-NH-CH[CH_2-CH(CH_3)$_2$]$_2$ (SEQ ID NO:1);

DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-O-CH[CH_2-CH(CH_3)$_2$]$_2$ (SEQ ID NO:2);

DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-NH-CH(CH_2-CH_2-CH_2-CH_3)$_2$ (SEQ ID NO:3);

DTyr-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-NH-CH[CH_2-CH(CH_3)$_2$]$_2$ (SEQ ID NO:4).

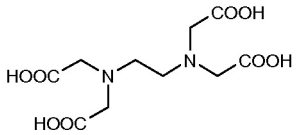
В некоторых из любых вышеуказанных вариантов его осуществления настоящее изобретение относится к соединениям, где радионуклид, металл M или радиоактивный атом галогена, пригоден для диагностического или терапевтического применения, в

частности для визуализации или радионуклидной терапии, и выбран из группы, включающей ^{111}In, ^{133m}In, ^{99m}Tc, ^{94m}Tc, ^{67}Ga, ^{66}Ga, ^{68}Ga, ^{52}Fe, ^{69}Er, ^{72}As, ^{97}Ru, ^{203}Pb, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{86}Y, ^{90}Y, ^{51}Cr, ^{52m}Mn, ^{157}Gd, ^{177}Lu, ^{161}Tb, ^{169}Yb, ^{175}Yb, ^{105}Rh, ^{166}Dy, ^{166}Ho, ^{153}Sm, ^{149}Pm, ^{151}Pm, ^{172}Tm, ^{121}Sn, ^{177m}Sn, ^{213}Bi, ^{142}Pr, ^{143}Pr, ^{198}Au, ^{199}Au, галогены: ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{18}F и др.

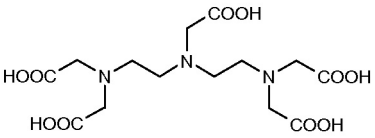
В некоторых из любых вышеуказанных вариантов его осуществления настоящее изобретение относится к соединениям, где хелатирующим металлы агентом C является хелатирующий металлы агент для двух- и трехвалентных металлов.

В некоторых из любых вышеуказанных вариантов его осуществления настоящее изобретение относится к соединениям, где хелатирующим металлы агентом для двух- и трехвалентных металлов являются хелатирующие металлы агенты на основе DTPA-, NOTA-, DOTA- или TETA или их моно- или бифункциональные производные.

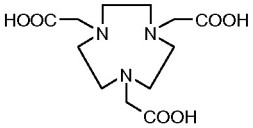
В некоторых из любых вышеуказанных вариантов его осуществления настоящее изобретение относится к соединениям, где хелатирующий металлы агент C выбран из группы, которая включает:



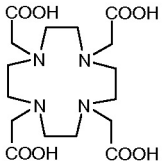
EDTA



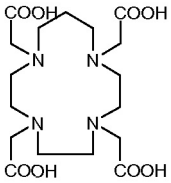
DTPA



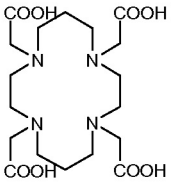
NOTA



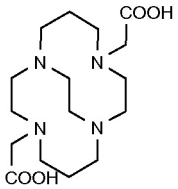
DOTA



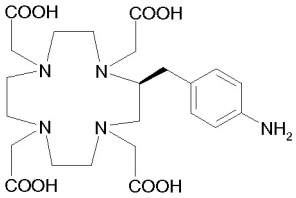
TRITA



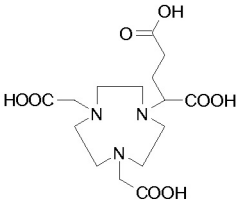
TETA



CB-TE2A



бифункциональный DOTA



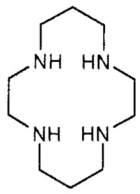
бифункциональный NOTA

В некоторых из любых вышеуказанных вариантов его осуществления настоящее

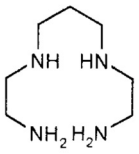
изобретение относится к соединениям, где хелатирующий металлы агент C представляет собой хелатирующий металлы агент для технеция или рения.

В некоторых из любых вышеуказанных вариантов его осуществления настоящее изобретение относится к соединениям, где C выбран из ациклических тетрааминовых, цикламовых, PnAO- или тетрадентатных хелатообразующих агентов, содержащих наборы донорных атомов P_2S_2-, N_2S_2- и N_3S-, и их моно- и бифункциональных производных или из хелатообразующих агентов на основе HYNIC/солигандов, или би- и тридентатных хелатообразующих агентов, формирующих металлоорганические комплексы по трикарбонильному способу.

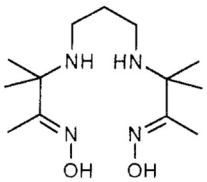
В некоторых из любых вышеуказанных вариантов его осуществления настоящее изобретение относится к соединениям, где C выбран из группы, которая включает:



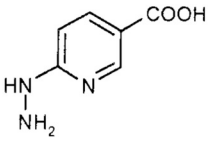
циклам



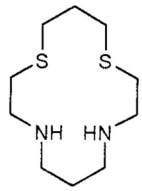
N_4



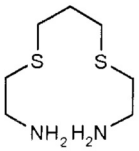
PnAO



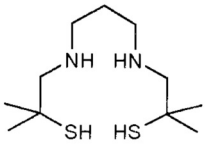
HYNIC



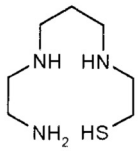
N_2S_2-циклам



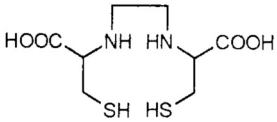
S_2N_2



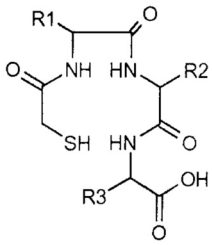
N_2S_2



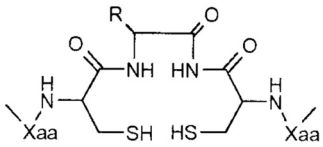
N_3S



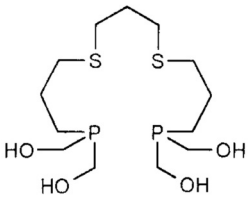
ECD



MAG_3 (R1 = R2 = R3 = H)

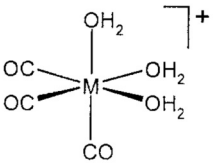


-Xaa-Cys-Xaa-Cys-Xaa-



P_2S_2

или :

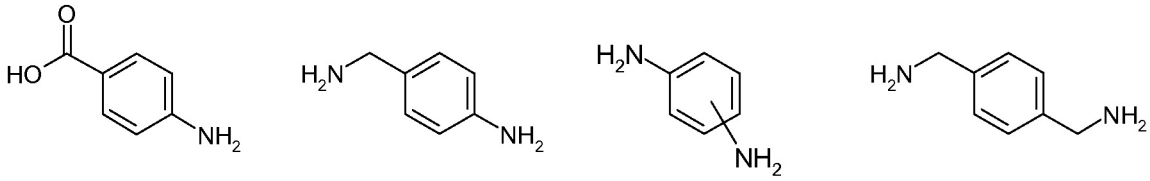


M = Tc, Re .

В некоторых из любых вышеуказанных вариантов его осуществления настоящее изобретение относится к соединениям, где разделительная группа S расположена между P и C, связана с ними ковалентными связями и может быть выбрана таким образом, чтобы обеспечить возможность для осуществления (радио)иодирования.

В некоторых из любых вышеуказанных вариантов его осуществления настоящее изобретение относится к соединениям, где S выбрана из группы, которая включает:

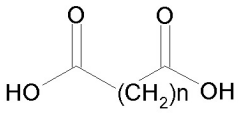
а) арил, содержащий остатки формул:



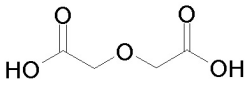
PABA PABZA PDA PAMBZA

где PABA обозначает п-аминобензойную кислоту, PABZA обозначает п-аминобензиламин, PDA обозначает фенилендиамин, а PAMBZA обозначает (аминометил) бензиламин;

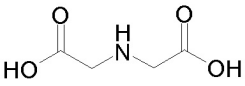
b) дикарбоновые кислоты, ω-аминокарбоновые кислоты, α,ω-диаминокарбоновые кислоты или диамины формулы:



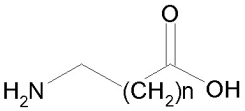
n = 0, 1, 2,...



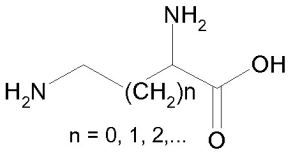
DIG



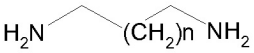
IDA



n = 0, 1, 2,...



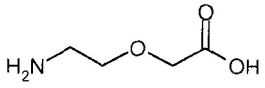
n = 0, 1, 2,...

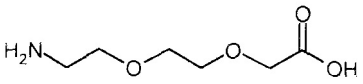


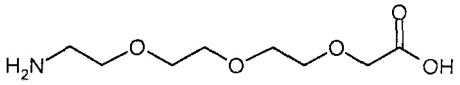
n = 0, 1, 2,...

где DIG обозначает дигликолевую кислоту, а IDA обозначает иминодиуксусную кислоту;

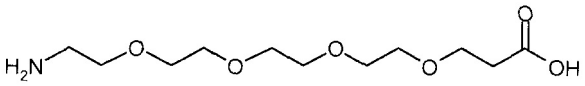
c) PEG разделительные группы различной длиной цепи, в частности, PEG разделительные группы, выбранные из формул:

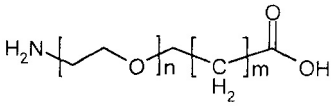

PEG-1


PEG-2

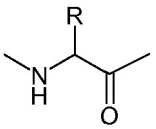

PEG-3

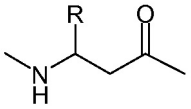
,


PEG-4


n = 1, 2, 3,... до 36
m = 0, 1, 2, 3, 4, 5

c) α- и β-аминокислоты, одиночные или в гомологичных цепях с различной длиной цепи или в гетерологичных цепях с различной длиной цепи, в частности:

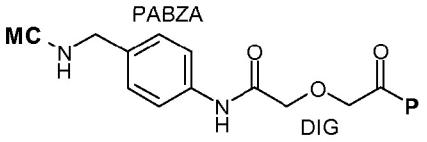

Xaa

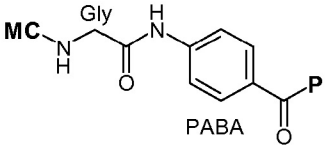

βXaa

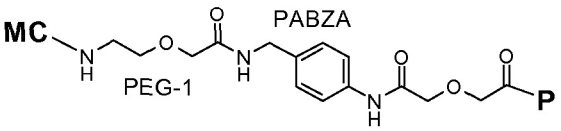
GRP (1-18), GRP (14-18), GRP (13-18), BBN (1-5) или [Tyr^4]-BBN(1-5); или

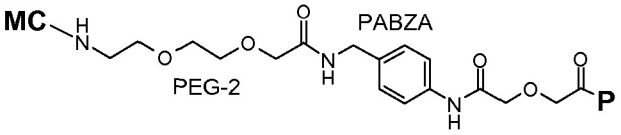
d) комбинации a, b и c.

В некоторых из любых вышеуказанных вариантов его осуществления настоящее изобретение относится к антагонистам GRPR, выбранным из группы, которая включает соединения со следующими формулами:


PABZA: п-аминобензиламин
DIG: дигликолевая кислота


PABA: п-аминобензойная кислота


Дигликолевая кислота


Дигликолевая кислота

где MC и P имеют указанные ранее значения.

В некоторых вариантах его осуществления настоящее изобретение относится к антагонистам GRPR, которые описаны в любом из указанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения, для применения в качестве лекарственного средства.

В некоторых вариантах его осуществления настоящее изобретение относится к антагонистам GRPR, которые описаны в любом из указанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения, для применения в качестве диагностического или терапевтического агента с целью обнаружения, диагностики или лечения первичного и/или метастатического $GRPR^+$ онкологического заболевания.

В некоторых вариантах его осуществления настоящее изобретение относится к антагонистам GRPR, которые описаны в любом из указанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения, где онкологическое заболевание выбрано из рака предстательной железы, рака молочной железы, мелкоклеточного рака легкого, карциномы толстого кишечника, желудочно-кишечных стромальных опухолей, гастриномы, почечно-клеточной карциномы, гастроэнтеропанкреатических нейроэндокринных опухолей, опухолей сквамозных клеток пищевода, нейробластомы, карциномы сквамозных клеток головы и шеи, а также из опухолей яичников, эндометрия и поджелудочной железы, проявляющих связанную с новообразованиями сосудистую систему, и является $GRPR^+$ онкологическим заболеванием.

В некоторых вариантах его осуществления настоящее изобретение относится к антагонистам GRPR, которые описаны в любом из указанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения, где онкологическим заболеванием является онкологическое заболевание человека.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к терапевтической композиции, включающей антагонист GRPR, который описан в любом из указанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения, и терапевтически приемлемый наполнитель.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1A. Показывает биораспределение [^{111}In]-NeoBOMB-1 (^{111}In-DOTA-(п-аминобензиламиндигликолевая кислота)-[D-Phe^6, His-NHCH[($CH_2CH(CH_3)_2]_2$^{12}, des-Leu^{13}, des-Met^{14}]-BBN(6-14)) у самок мышей SCID, имеющих опухоли PC-3 ($hGRPR^+$).

Фигура 1B. Показывает радиохроматограмму крови мышей ex vivo через 5 мин после инъекции [^{111}In]-NeoBOMB-1.

Фигура 1C. Показывает биораспределение [^{177}Lu]-NeoBOMB-1 (^{177}Lu-DOTA-(п-аминобензиламиндигликолевая кислота)-[D-Phe^6, His-NHCH[($CH_2CH(CH_3)_2]_2$^{12}, des-Leu^{13}, des-Met^{14}]-BBN (6-14)) у самок мышей SCID, имеющих опухоли PC-3 ($hGRPR^+$).

Фигура 1D. Показывает радиохроматограмму крови мышей ex vivo через 5 мин после инъекции [^{177}Lu]-NeoBOMB-1.

Фигура 1E. Показывает биораспределение [^{67}Ga]-NeoBOMB-1 (^{67}Ga-DOTA-(п-аминобензиламиндигликолевая кислота)-[D-Phe^6, His-NHCH[($CH_2CH(CH_3)_2]_2$^{12}, des-Leu^{13}, des-Met^{14}]-BBN (6-14)) у самок мышей SCID, имеющих опухоли PC-3 ($hGRPR^+$).

Фигура 1F. Показывает радиохроматограмму крови мышей ex vivo через 5 мин после

инъекции [^{67}Ga]NeoBOMB-1.

Фигура 2A. Показывает биораспределение [^{99m}Tc]-NeoBOMB-2 (^{99m}Tc-N_4-(п-аминобензиламиндигликолевая кислота)-[D-Phe^6, His-NHCH[($CH_2CH(CH_3)_2]_2$^{12}, des-Leu^{13}, des-Met^{14}]-BBN (6-14)) у самок мышей SCID, имеющих опухоли PC-3 (hGRPR$^+$).

Фигура 2B. Показывает радиохроматограмму крови мышей ex vivo через 5 мин после введения [^{99m}Tc]-NeoBOMB-2.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Исследование, которое привело к настоящему изобретению, неожиданно выявило альтернативный маршрут для эффективного in vivo нацеливания на соматостатин-позитивные опухоли, а именно, использование антагонистов рецептора соматостатина. Самое удивительное заключается в том, что, несмотря на их неспособность к интернализации, подобные аналоги демонстрируют гораздо более сильный захват и удерживание в ксенотрансплантатах животных и очень быстрое вымывание из фоновых тканей.

Предварительным объяснением более сильного захвата опухолью антагонистов рецепторов соматостатина является их способность связываться с существенно большим количеством от общей популяции рецепторов соматостатина, доступных на клеточной мембране раковых клеток, по сравнению с их интернализующимися агонистическими аналогами.

В соответствии с настоящим изобретением, антагонисты GRPR химически модифицированы с тем, чтобы добиться для них устойчивого связывания диагностического и/или терапевтического радионуклида. После введения человеку или животному-субъекту они служат в качестве молекулярного носителя для передачи радиодиагностического сигнала и/или радиотоксичной нагрузки к первичной GRPR$^+$-опухоли и ее метастазам.

В частности, в соответствии с изобретением было неожиданно обнаружено, что введение некоторых новых радиолигандов на основе антагониста GRPR, в отличие от [^{99m}Tc]-демобезина 1, приводит к беспрецедентно высокому и специфичному захвату и удивительно длительному удерживанию ксенотрансплантатов GRPR$^+$ человека у мышей. Кроме того, указанные агенты показали значительно более высокую метаболическую стабильность после инъекции мышам по сравнению с [^{99m}Tc]-демобезином 1.

Антагонисты GRPR по настоящему изобретению имеют важные структурные различия, по сравнению с исходным фрагментом [^{99m}Tc]-демобезина 1. Во-первых, введение в них метки с помощью широкого круга двух- и трехвалентных радиоактивных металлов, а также с ^{99m}Tc и $^{186/188}$Re стало возможным благодаря связыванию подходящими бифункциональными хелатообразующими агентами, имеющимися на их N-конце в дополнение к родственной тетраамину структуре. Таким образом, рентгенодиагностическая визуализация возможна при использовании SPECT и PET с источниками гамма-излучения и позитронов, хотя введение метки бета-, Оже- и альфа-излучателей также осуществимо, что открывает возможности для терапевтических применений. Кроме того, их метаболическая стабильность и фармакокинетический профиль, в особенности с точки зрения удерживания опухолью, значительно улучшились, как показывают результаты длительного доклинического изучения биораспределения

для самок SCID мышей, имеющих ксенотрансплантаты PC-3 человека.

Более конкретно, структура новых аналогов включает следующие части:

a) Хелатообразующий агент присоединен к N-концу; им может быть любой из ациклических или циклических тетрааминов, HYNIC, N_3S-хелатообразующие агенты и их производные, линейные или циклические полиамины и полиаминополикарбоксилаты, такие как DTPA, EDTA, DOTA, NOTA, NOTAGA, TETA и их производные, и др. Кроме того, в указанную позицию может быть введена подходящая группа, например, простетическая группа или Tyr- с целью введения радиоактивного атома галогена.

b) Радионуклиды; ими могут быть i) источник гамма-излучения, такой как ^{99m}Tc, ^{111}In, ^{67}Ga, ^{131}I, ^{125}I и др., который пригоден для визуализации с помощью обычной гамма-камеры, SPECT или гибридной системы SPECT/CT или SPECT/MRI; ii) источник позитронов, такой как ^{68}Ga, ^{66}Ga, ^{64}Cu, ^{86}Y, ^{44}Sc, ^{124}I, ^{18}F и др., который подходит для визуализации с помощью PET или гибридной системы PET/CT или PET/MRI, или iii) источник бета-, Оже- или альфа-излучателей, такой как, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{90}Y, ^{177}Lu, ^{111}In, ^{67}Cu, ^{212}Bi, ^{175}Yb, ^{47}Sc, ^{131}I, ^{125}I и т.д., который подходит для радионуклидной терапии.

c) Промежуточная группа между хелатообразующим и пептидным фрагментом, которая может отличаться по длине, типу и липофильности и может включать PEGx (x=0-20), природные и не встречающиеся в природе аминокислоты, сахара, алкиламиновые остатки или их комбинации.

d) Пептидная цепь, в которой проведена замена ключевых аминокислот с помощью D-аминокислот, не встречающихся в природе аминокислот и других подходящие остатков.

e) C-конец, где отсутствуют оба Leu^{13} и Met^{14}-NH_2 в нативной последовательности BBN. Концевой His^{12} присутствует в амидной или сложноэфирной форме, при этом амиды или сложные эфиры могут быть представлены несколькими моно- и диалкиламидами, ароматическими амидами или смешанными алкил-арильными амидами или алкиловыми и/или ариловыми сложными эфирами.

Таким образом, настоящее изобретение относится к антагонистам GRPR общей формулы

MC-S-P,

где:

MC обозначает хелатирующий металлы агент, который включает:

- по меньшей мере, один (радиоактивный) атом металла (M) и хелатирующий агент (C), который устойчиво связывает M; в качестве альтернативы, MC может обозначать Tyr- или простетическую группу, несущую (радиоактивный) атом галогена;

S обозначает необязательную разделительную группу, расположенную между N-концом P и C и присоединенную к ним ковалентными связями, которая может быть выбрана таким образом, чтобы обеспечить условия для введения (радиоактивного) атома галогена;

P обозначает антагонист пептидного рецептора GRP общей формулы:

Xaa_1-Xaa_2-Xaa_3-Xaa_4-Xaa_5-Xaa_6-Xaa_7-Z,

где:

Xaa_1 отсутствует или выбран из группы, включающей аминокислотные остатки Asn, Thr, Phe, 3-(2-тиенил)аланин (Thi), 4-хлорфенилаланин (Cpa), α-нафтилаланин (α-Nal), β-нафтилаланин (β-Nal), 1,2,3,4-тетрагидроноргарман-3-карбоновую кислоту (Tpi), Tyr,

3-иод-тирозин (o-I-Tyr), Trp, пентафторфенилаланин (5-F-Phe) (все в виде L- или D-изомеров);

Xaa_2 обозначает Gln, Asn, His;

Xaa_3 обозначает Trp, 1,2,3,4-тетрагидроноргарман-3-карбоновую кислоту (Tpi);

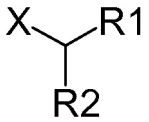
Xaa_4 обозначает Ala, Ser, Val;

Xaa_5 обозначает Val, Ser, Thr;

Xaa_6 обозначает Gly, саркозин (Sar), D-Ala, β-Ala;

Xaa_7 обозначает His, (3-метил)гистидин (3-Me)His;

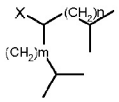
Z выбран из -NHOH, $-NHNH_2$, -NH-алкила, $-N(алкил)_2$ или -O-алкила, или



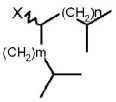
,

где X представляет собой NH (амид) или O (сложный эфир), а R1 и R2 одинаковы или различны и выбраны из протона, (замещенного) алкила, (замещенного) алкилового эфира, арила, арилового эфира или алкил-, галоген-, гидроксил- или гидроксиалкилзамещенной ароматической группы.

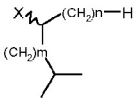
Z, предпочтительно, выбран из одной из следующих формул, где X обозначает NH или O:



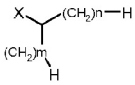
m = n = 0, 1, 2, 3



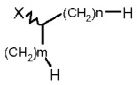
m # n = 0, 1, 2, 3



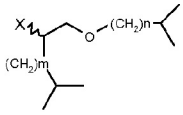
m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2, ...9



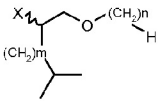
m = n = 0, 1, 2,...9



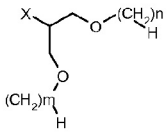
m # n = 0, 1, 2,...9



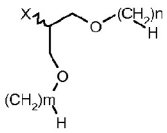
m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2, ...5



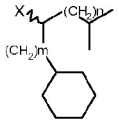
m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2, ...7



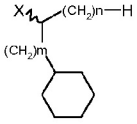
m = n = 1, 2, 3,...7



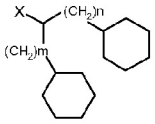
m # n = 1, 2, 3,...7



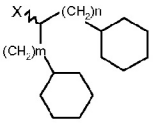
m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...7



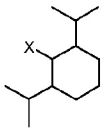
m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...9

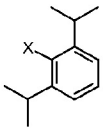


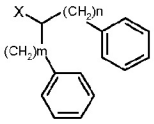
m = n = 0, 1, 2, 3



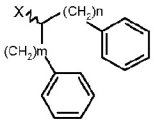
m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...9



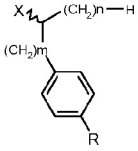




m = n = 0, 1, 2, 3

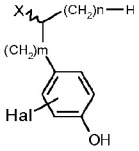


m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...9



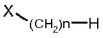
R = H, Cl, Br, I

m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...9

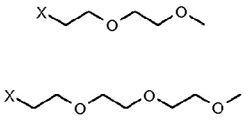


Hal = Cl, Br, I

m = 0, 1, 2, 3
n = 0, 1, 2,...9



n = 1, 2, 3,...10



Предпочтительно, R1 такой же, как R2.

В антагонистах GRPR по настоящему изобретению, предпочтительно, P выбран из группы, включающей:

DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-NH-CH[CH_2-CH(CH_3)$_2$]$_2$ (SEQ ID NO:1);

DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-O-CH[CH_2-CH(CH_3)$_2$]$_2$ (SEQ ID NO:2);

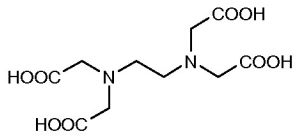
DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-NH-CH(CH_2-CH_2-CH_2-CH_3)$_2$ (SEQ ID NO:3);

DTyr-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-NH-CH[CH_2-CH(CH_3)$_2$]$_2$ (SEQ ID NO:4).

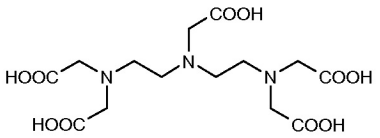
Радионуклид, металл M или радиоактивный атом галогена, пригоден для диагностического или терапевтического применения, в частности для визуализации или радионуклидной терапии, и, преимущественно, выбран из группы, включающей ^{111}In, ^{133m}In, ^{99m}Tc, ^{94m}Tc, ^{67}Ga, ^{66}Ga, ^{68}Ga, ^{52}Fe, ^{69}Er, ^{72}As, ^{97}Ru, ^{203}Pb, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{86}Y, ^{90}Y, ^{51}Cr, ^{52m}Mn, ^{157}Gd, ^{177}Lu, ^{161}Tb, ^{169}Yb, ^{175}Yb, ^{105}Rh, ^{166}Dy, ^{166}Ho, ^{153}Sm, ^{149}Pm, ^{151}Pm, ^{172}Tm, ^{121}Sn, ^{177m}Sn, ^{213}Bi, ^{142}Pr, ^{143}Pr, ^{198}Au, ^{199}Au, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{18}F и др.

Хелатирующий металлы агент C, преимущественно, представляет собой хелатирующий металлы агент для двух- и трехвалентных металлов и, в частности, является хелатирующим металлы агентом на основе DTPA-, NOTA-, DOTA- или TETA или на основе их моно- или бифункционального производного.

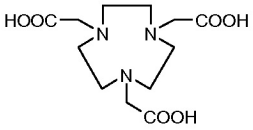
Хелатирующий металлы агент C, преимущественно, выбран из группы, которая включает:



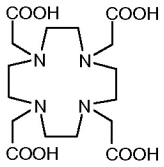
EDTA



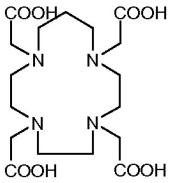
DTPA



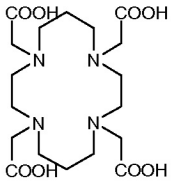
NOTA



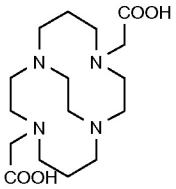
DOTA



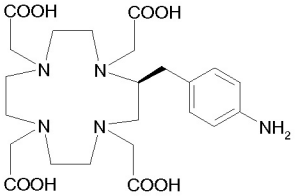
TRITA



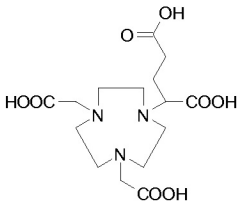
TETA



CB-TE2A



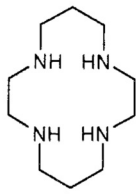
бифункциональный DOTA



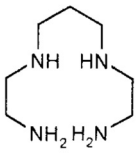
бифункциональный NOTA

В том случае, когда хелатирующий металлы агент C представляет собой хелатирующий металлы агент для технеция или рения, он, преимущественно, выбран из ациклических тетрааминовых, цикламовых, PnAO- или тетрадентатных хелатообразующих агентов, содержащих наборы донорных атомов P_2S_2-, N_2S_2- и N_3S-, и их моно- и бифункциональных производных или из хелатообразующих агентов на основе HYNIC/солигандов, или би- и тридентатных хелатообразующих агентов, формирующих металлоорганические комплексы по трикарбонильному способу.

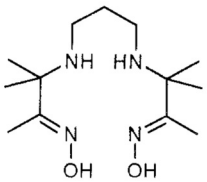
Подходящими примерами C являются:



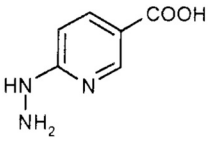
циклам



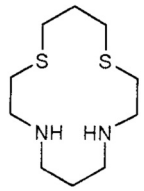
N_4



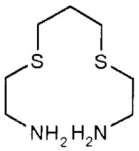
PnAO



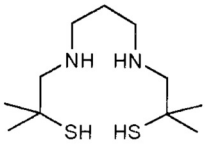
HYNIC



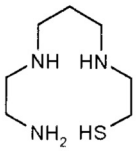
N_2S_2-циклам



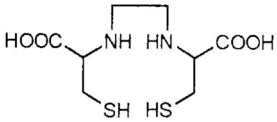
S_2N_2



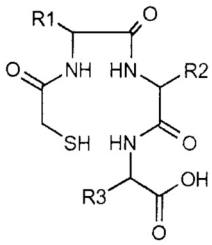
N_2S_2



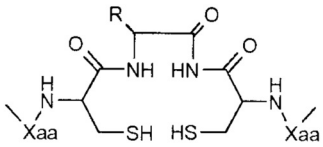
N_3S



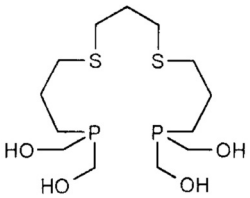
ECD



MAG_3 (R1 = R2 = R3 = H)

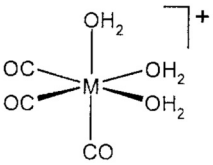


-Xaa-Cys-Xaa-Cys-Xaa-



P_2S_2

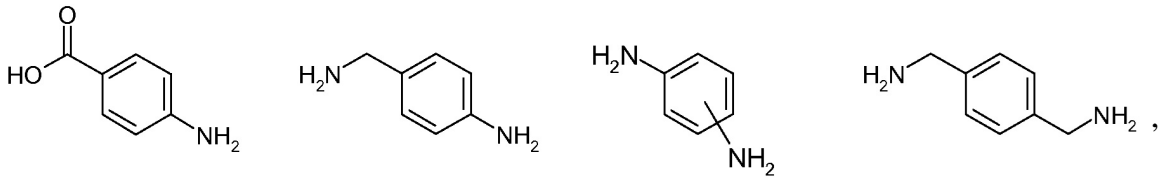
или :



M = Tc, Re .

Разделительная группа S расположена между P и C, связана с ними ковалентными связями и может быть выбрана таким образом, чтобы обеспечить возможность для осуществления (радио)иодирования. Разделительная группа, преимущественно, выбрана из группы, которая включает:

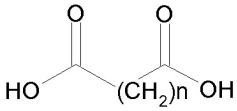
а) арил, содержащий остатки формул:



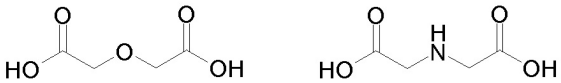
PABA PABZA PDA PAMBZA

где PABA обозначает п-аминобензойную кислоту, PABZA обозначает п-аминобензиламин, PDA обозначает фенилендиамин, а PAMBZA обозначает (аминометил) бензиламин;

b) дикарбоновые кислоты, ω-аминокарбоновые кислоты, α,ω-диаминокарбоновые кислоты или диамины формулы:

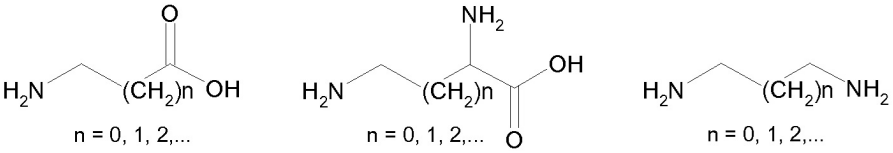


n = 0, 1, 2,...



DIG IDA

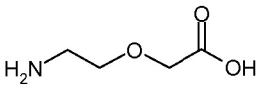
,



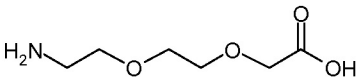
n = 0, 1, 2,... n = 0, 1, 2,... n = 0, 1, 2,...

где DIG обозначает дигликолевую кислоту, а IDA обозначает иминодиуксусную кислоту;

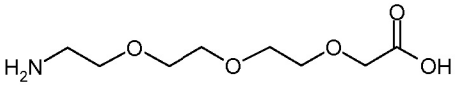
c) PEG разделительные группы различной длиной цепи, в частности, PEG разделительные группы, выбранные из формул:



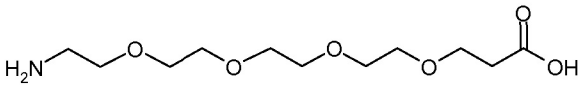
PEG-1



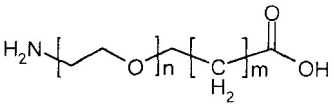
PEG-2



PEG-3

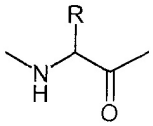


PEG-4

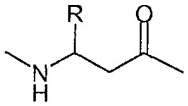


n = 1, 2, 3,... до 36
m = 0, 1, 2, 3, 4, 5

d) α- и β-аминокислоты, одиночные или в гомологичных цепях с различной длиной цепи или в гетерологичных цепях с различной длиной цепи, в частности:



Xaa

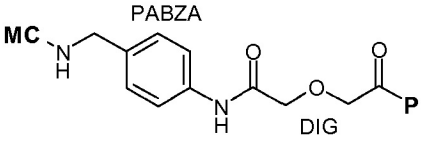


βXaa

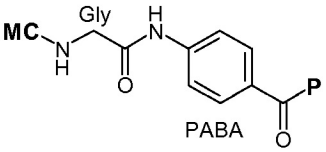
GRP (1-18), GRP (14-18), GRP (13-18), BBN (1-5) или [Tyr^4]-BBN(1-5); или

e) комбинации a, b и c.

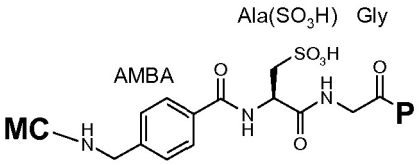
Антагонисты GRPR по настоящему изобретению, преимущественно, выбраны из группы, которая включает соединения со следующими формулами:



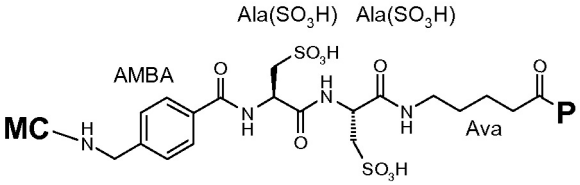
PABZA: п-аминобензиламин
DIG: дигликолевая кислота



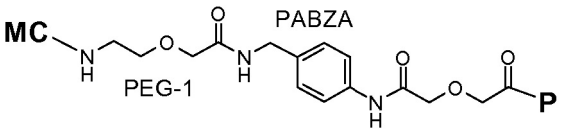
PABA: п-аминобензойная кислота



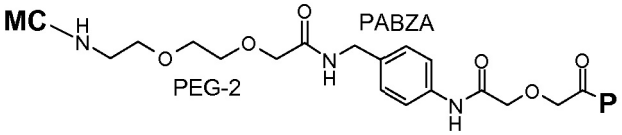
AMBA: 4-(аминометил)бензойная кислота



Ava: ω-аминовалериановая кислота



Дигликолевая кислота



Дигликолевая кислота

где MC и P имеют указанные ранее значения.

Следует понимать, что конкретные химические структуры, описанные здесь, являются иллюстративными примерами различных вариантов осуществления настоящего изобретения и что антагонисты GRPR общей формулы: MC-S-P не ограничиваются приведенными примерами структур.

Настоящее изобретение также относится к терапевтической композиции, включающей

приведенный в формуле изобретения антагонист GRPR и терапевтически приемлемый инертный наполнитель.

Настоящее изобретение также относится к приведенному в формуле изобретения антагонисту GRPR для использования в качестве лекарственного средства. Лекарственное средство, предпочтительно, представляет собой диагностический или терапевтический агент для диагностики или лечения первичных и/или метастатических $GRPR^+$ онкологических заболеваний, таких как, среди прочих, рак предстательной железы, рак молочной железы, мелкоклеточный рак легкого, карцинома толстого кишечника, желудочно-кишечные стромальные опухоли, гастринома, почечно-клеточные карциномы, гастроэнтеропанкреатические нейроэндокринные опухоли, опухоли сквамозных клеток пищевода, нейробластомы, карциномы сквамозных клеток головы и шеи, а также сосудистая система опухолей яичников, эндометрия и поджелудочной железы.

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрируется приведенными ниже примерами, которые не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие настоящее изобретение.

ПРИМЕР

ВВЕДЕНИЕ

Соединения по настоящему изобретению готовят и испытывают, как описано ниже. Следующие раскрытые варианты осуществления настоящего изобретения являются просто характерными примерами осуществления изобретения, которые могут быть воплощены в различных формах. Таким образом, конкретные структурные, функциональные и процедурные детали, раскрытые в следующих примерах, не следует рассматривать как ограничивающие настоящее изобретение.

СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ

Введение радиоактивной метки и контроль качества

Введение метки ^{111}In

Хлорид индия (In-111) в 50 мМ растворе HCl приобретают у компании Mallinckrodt Medical B.V., Петтен, Нидерланды, с концентрацией активности 10-20 мКи/мл. В общем случае в конъюгаты DOTA-пептид по настоящему изобретению вносят радиоактивную метку индия-111 с удельной активностью 0,1-0,2 мКи In-111/нмоль конъюгата DOTA-пептид. Вкратце, 3-15 нмоль конъюгата DOTA-пептид, растворенного в воде, смешивают с 2,5-12,5 мкл 1,0 М буферного раствора ацетата натрия с pH 4,6, 1-5 мкл 0,1 М раствора аскорбата натрия в воде и 30-150 мкл раствора $^{111}InCl_3$ (0,3-3,0 мКи). Реакционную смесь для введения радиоактивной метки инкубируют на бане с кипящей водой в течение 20-30 мин. Для контроля качества аликвоту 2 мкл раствора для введения радиоактивной метки гасят с помощью 28 мкл ацетатного буферного раствора Na_2-EDTA (5 мМ, pH 4,6). После успешного внесения радиоактивной метки (более 95% связанной пептидом радиоактивности) к раствору для введения радиоактивной метки добавляют Na_2-EDTA (0,1 М, pH 4,6) до конечной концентрации 1 мМ.

Введение метки ^{67}Ga

Хлорид галлия (Ga-67) получают либо в разбавленном растворе HCl с концентрацией активности 498-743 мКи/мл от компании Nordion, Wesbrook Mall, Ванкувер, Канада, либо с концентрацией активности 80 мКи/мл от компании Mallinckrodt Medical B.V., Петтен, Нидерланды.

В общем случае в конъюгаты DOTA-пептид по настоящему изобретению вносят

радиоактивную метку галия-67 с удельной активностью 0,1-0,2 мКи Ga-67/нмоль конъюгата DOTA-пептид. Вкратце, 3-15 нмоль конъюгата DOTA-пептид, растворенного в воде, смешивают с 50-125 мкл 1,0 М буферного раствора ацетата натрия с pH 4,0 и 5-15 мкл раствора $^{67}GaCl_3$ (0,5-3,0 мКи). Реакционную смесь для введения радиоактивной метки инкубируют на бане с кипящей водой в течение 30 мин. Аликвоту 2 мкл раствора для введения радиоактивной метки, которую используют для контроля качества методом ВЭЖХ, гасят с помощью 28 мкл ацетатного буферного раствора Na_2-EDTA (5 мМ, pH 4,0). После успешного внесения радиоактивной метки (более 95% связанной пептидом радиоактивности) к раствору для введения радиоактивной метки добавляют Na_2-EDTA (0,1 М, pH 4,0) до конечной концентрации 1 мМ.

Введение метки ^{177}Lu

Хлорид лютеция (Lu-177) в 50 мМ растворе HCl приобретают у компании IDB Radiopharmacy, Нидерланды с концентрацией активности 100 мКи/мл.

В общем случае в конъюгат DOTA-пептид по настоящему изобретению вводят радиоактивную метку лютеция-177 с удельной активностью до 0,5 мКи Lu-177/нмоль конъюгата DOTA-пептид. Вкратце, 3-15 нмоль конъюгата DOTA-пептид, растворенного в воде, смешивают с 4-16 мкл 1,0 М буфера ацетата натрия с pH 4,6 и 15-75 мкл раствора $^{67}GaCl_3$ (1,5-7,5 мКи). Радиолиз сводят к минимуму путем добавления 5 мкл гентизиновой кислоты (80 мМ), растворенной в 0,2 М растворе аскорбата натрия. Реакционную смесь инкубируют на бане с кипящей водой в течение 30 мин. Аликвоту 2 мкл раствора для введения радиоактивной метки, которую используют для контроля качества методом ВЭЖХ, гасят с помощью 28 мкл ацетатного буферного раствора Na_2-EDTA (5 мМ, pH 4,6). После успешного внесения радиоактивной метки (более 95% связанной пептидом радиоактивности) к раствору для введения радиоактивной метки добавляют Na_2-EDTA (0,1 М, pH 4,6) до конечной концентрации 1 мМ.

Введение метки ^{99m}Tc

Конденсированные с тетраамином пептиды растворяют в смеси 50 мМ раствора уксусной кислоты/этанол 8/2 об/об до конечной концентрации 1 мМ пептида. Каждый базовый раствор в виде аликвот по 50 мкл размещают в пробирки Эппендорфа и хранят при температуре -20°C. Внесение метки осуществляют в склянке Эппендорфа, в которую последовательно добавляют следующие растворы: i) 0,5 М фосфатный буфер с pH 11,5 (50 мкл), ii) 0,1 М раствор цитрата натрия (5 мкл), iii) экстракт генератора [^{99m}Tc]-$NaTcO_4$ (415 мл, 10-20 мКи), iv) маточный раствор конъюгата пептида (15 мкл, 15 нмоль) и v) свежеприготовленный раствор $SnCl_2$ в этаноле (30 мкг, 15 мкл). После проведения реакции в течение 30 мин при комнатной температуре pH доводят до ~7, добавляя 1 М раствор HCl (10 мкл).

Контроль качества

Анализ методом ВЭЖХ проводят на хроматографе Waters (Waters, Вена, Австрия), успешно работающем вместе с системой 600 подачи растворителя; хроматограф сопряжен с двойным устройством обнаружения, включающим фотодиодную матрицу УФ-детектора (Waters модели 996 или модели 2998) и счетчик гамма-излучения Gabi компании Raytest (RSM Analytische Instrumente GmbH, Германия). Обработку данных и процесс хроматографии контролируют с использованием программного обеспечения Millennium или Empower 2 (Waters, США). Колонку XBridge Shield RP18 (5 мкм, 4,6×150 мм, Waters, Ирландия) в сочетании с соответствующей 2 см защитной колонкой

элюируют при скорости потока 1 мл/мин в линейном градиенте, начиная с 10% B с последующим 70% B в течение 60 мин, при этом растворитель A=0,1%-ный водный раствор трифторуксусной кислоты, а растворитель B = ацетонитрил.

Метаболическое исследование на мышах

Инъекции радиолиганда и отбор крови

Болюс, содержащий радиолиганд в нормальном физиологическом растворе (100-150 мкл, ≈3 нмоль, 200-500 мкКи), вводят в хвостовую вену швейцарских мышей-альбиносов. Животных содержат в течение 5 мин в клетке с доступом к воде, а затем быстро умерщвляют путем пункции сердца под мягким эфирным наркозом. Кровь (500-900 мкл) отбирают из сердца с помощью шприца и переносят в предварительно охлажденную пробирку Эппендорфа на льду.

Разделение плазмы и подготовка проб

Кровь центрифугируют для удаления клеток крови (10 мин, 2000 g/4°C). Плазму собирают, смешивают с ацетонитрилом (MeCN) в соотношении 1/1 об/об и снова центрифугируют (10 мин, 15000 g/4°C). Супернатанты концентрируют до небольшого объема (в слабом потоке N_2 при 40°C), разводят физиологическим раствором (≈400 мкл) и фильтруют через фильтр Millex GV (0,22 мкм).

Анализ методом ВЭЖХ для обнаружения радиометаболитов

Аликвоты образцов плазмы (полученной, как описано выше) помещают в колонку Symmetry Shield RPM, которую элюируют при скорости подачи 1,0 мл/мин в следующем градиенте: от 100% A до 90% A в течение 10 мин и от 90% A до 60% A в течение следующих 60 мин (A=0,1% водный раствор трифторуксусной кислоты (об./об.) и B= MeCN). Элюирование радиокомпонентов контролируют с помощью детектора гамма-излучения. Для ^{99m}Tc-радиопептидов проводят параллельно анализ ITLC-SG, используя ацетон в качестве элюента, чтобы обнаружить следы высвобожденного TcO_4^- (TcO_4^-, Rf=1,0).

Исследования на мышах, имеющих опухоль $GRPR^+$

Индукция опухолевого роста

Болюс ≈150 мкл, содержащий суспензию $1{,}5\times10^7$ свежеотобранных PC-3 клеток человека в нормальном физиологическом растворе, подкожно водят в боковую поверхность живота самок мышей SCID. Животных содержат в асептических условиях и по прошествии 2-3 недель у них развиваются хорошо пальпируемые опухоли в месте прививки (80-150 мг).

Биораспределение и расчет результатов

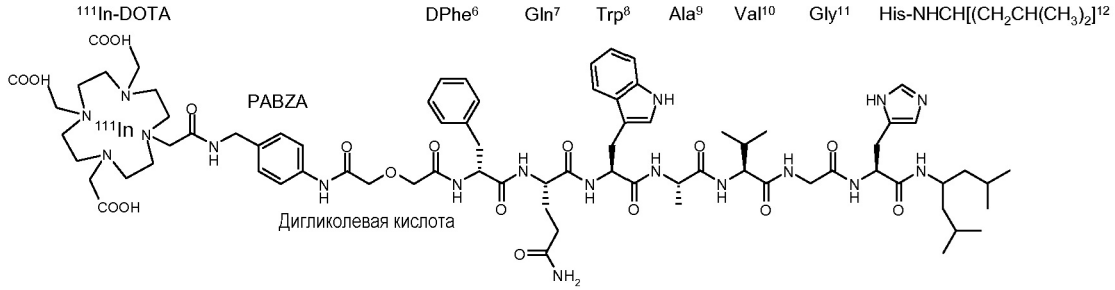
В день эксперимента выбранный радиопептид вводят в хвостовую вену мышей с опухолями в виде 100 мкл болюса (1-2 мкКи, в общей сложности 10 пмоль пептида; в смеси физиологический раствор/EtOH 9/1 об/об). Животных умерщвляют в группах по четыре особи под легкой эфирной анестезией путем пункции сердца в заданные моменты времени pi (после инъекции). Дополнительным группам, включающим от трех до четырех животных, совместно вводят избыток [Tyr^4]-BBN (≈40 нмоль) вместе с тестируемым радиопептидом и умерщвляют в 4 час pi (блокированные животные). Представляющие интерес образцы крови и ткани сразу же отбирают, взвешивают и измеряют радиоактивность с помощью счетчика гамма-излучения. Содержимое желудка и кишечника не опорожняется, а их измерение проводят в том виде, как они получены. Данные по биораспределению рассчитывают в виде процента введенной дозы на грамм ткани (%ID/г), используя программу Microsoft Excel, с помощью подходящих стандартов

введенной дозы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

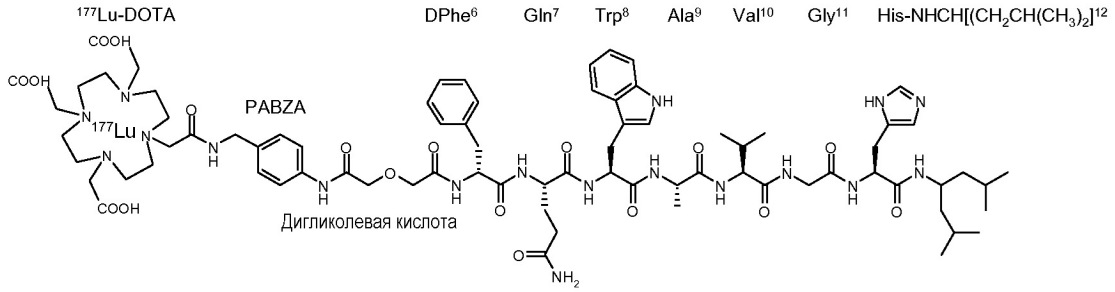
Результаты различных иллюстративных испытаний приведены ниже в данном описании со ссылкой на соответствующую фигуру. Конкретные структурные, функциональные и процедурные детали, описанные в приведенных результатах, не должны истолковываться как ограничивающие настоящее изобретение.

Фигура 1A: Биораспределение [^{111}In]-NeoBOMB-1 (^{111}In-DOTA-(п-аминобензиламиндигликолевая кислота)-[D-Phe^{6},His-NHCH[($CH_2CH(CH_3)_2]_2$^{12}, des-Leu^{13}, des-Met^{14}]-BBN (6-14)) у самок мышей SCID, имеющих опухоли PC-3 (hGRPR^{+}) в момент 4 час и 24 час pi. Столбцы показывают средний захват как % введенной дозы на грамм (% ID/г), по крайней мере, для 4 животных со стандартным отклонением; дополнительная группа животных получает избыток [Tyr^{4}]-BBN (100 мкг) для in vivo блокады рецепторов в момент 4 час pi. Bl = кровь, Li = печень, He = сердце, Ki = почки, St = желудок, In = кишечник, Sp = селезенка, Mu = мышцы, Lu = легкие, Pa = поджелудочная железа, Fe = бедро и Tu = опухоль PC-3. Высокая степень захвата и удерживания наблюдается в экспериментальной опухоли с величиной 28,6±6,0% ID/г в момент 4 час и 25,9±6,6% ID/г в момент 24 час. Указанный высокий процент захвата может быть существенно снижен путем совместной инъекции избытка нативного аналога бомбезина.



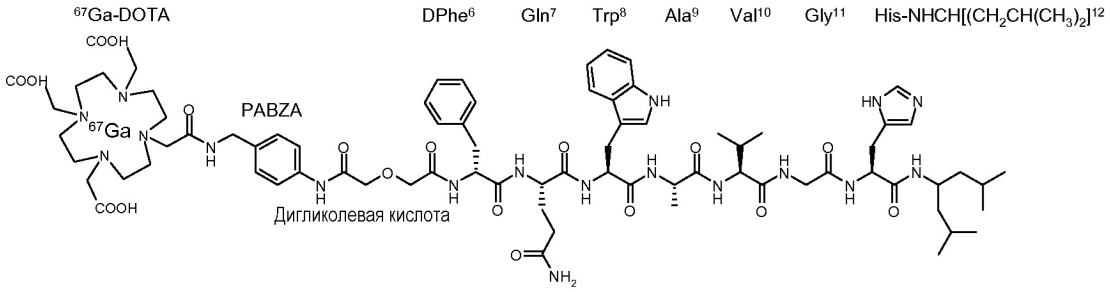
Фигура 1B: Радиохроматограмма ex vivo образцов крови мышей через 5 мин после инъекции [^{111}In]-NeoBOMB-1. Процент исходного пептида, оставшегося неизменным, составляет >91%.

Фигура 1C: Биораспределение [^{177}Lu]-NeoBOMB-1 (^{177}Lu-DOTA-(п-аминобензиламиндигликолевая кислота)-[D-Phe^{6},His-NHCH[($CH_2CH(CH_3)_2]_2$^{12}, des-Leu^{13}, des-Met^{14}]-BBN (6-14)) у самок мышей SCID, имеющих опухоли PC-3 (hGRPR^{+}) в момент 4 час, 24 час и 72 час pi. Столбцы показывают средний захват как % введенной дозы на грамм (% ID/г), по крайней мере, для 4 животных со стандартным отклонением; дополнительная группа животных получает избыток [Tyr^{4}]-BBN (100 мкг) для in vivo блокады рецепторов в момент 4 час pi. Bl = кровь, Li = печень, He = сердце, Ki = почки, St = желудок, In = кишечник, Sp = селезенка, Mu = мышцы, Lu = легкие, Pa = поджелудочная железа, Fe = бедро и Tu = опухоль PC-3. Захват в поджелудочной железе снижается с течением времени более быстрыми темпами, чем захват в опухоли, что приводит к более высоким отношениям опухоль/поджелудочная железа, в частности в момент 72 час pi.



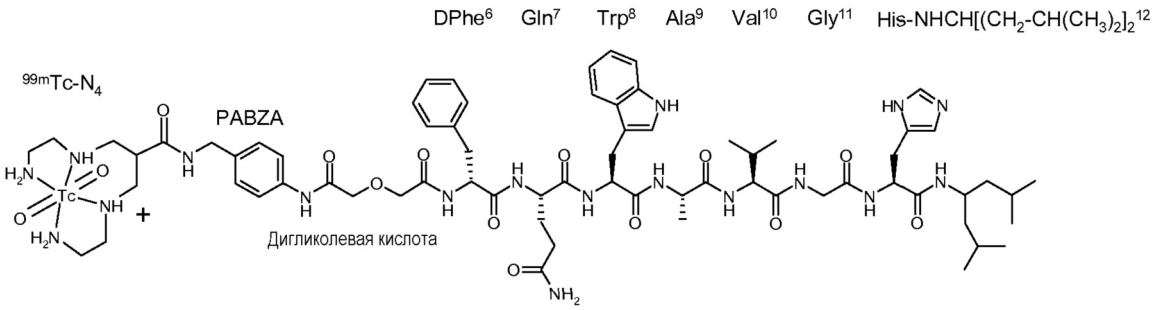
Фигура 1D: Радиохроматограмма ex vivo образцов крови мышей через 5 мин после инъекции [^{177}Lu]-NeoBOMB-1 показывает, что >92% исходного пептида остается неизменным.

Фигура 1E: Биораспределение [^{67}Ga]-NeoBOMB-1 (^{67}Ga-DOTA-(п-аминобензиламиндигликолевая кислота)-[D-Phe^{6},His-NHCH[$(CH_2CH(CH_3)_2]_2$^{12}, des-Leu^{13}, des-Met^{14}]-BBN (6-14)) у самок мышей SCID, имеющих опухоли PC-3 (hGRPR^{+}) в момент 1 час и 4 час pi. Столбцы показывают средний захват как % введенной дозы на грамм (% ID/г), по крайней мере, для 4 животных со стандартным отклонением; дополнительная группа животных получает избыток [Tyr^{4}]-BBN (100 мкг) для in vivo блокады рецепторов в момент 4 час pi. Bl = кровь, Li = печень, He = сердце, Ki = почки, St = желудок, In = кишечник, Sp = селезенка, Mu = мышцы, Lu = легкие, Pa = поджелудочная железа, Fe = бедро и Tu = опухоль PC-3. Высокие значения в опухолях (>30% ID/г) достигаются радиофармацевтическим средством в момент 1 час и 4 час pi.



Фигура 1F: Радиохроматограмма ex vivo образцов крови мышей через 5 мин после инъекции [^{67}Ga]-NeoBOMB-1 показывает, что >97% исходного пептида остается неизменным.

Фигура 2A: Биораспределение [^{99m}Tc]-NeoBOMB-2 (^{99m}Tc-N_4-(п-аминобензиламиндигликолевая кислота)-[D-Phe^{6},His-NHCH[$(CH_2CH(CH_3)_2]_2$^{12}, des-Leu^{13}, des-Met^{14}]-BBN (6-14)) у самок мышей SCID, имеющих опухоли PC-3 (hGRPR^{+}) в момент 1 час, 4 час и 24 час pi. Столбцы показывают средний захват как % введенной дозы на грамм (% ID/г), по крайней мере, для 4 животных со стандартным отклонением; дополнительная группа животных получает избыток [Tyr^{4}]-BBN (100 мкг) для in vivo блокады рецепторов в момент 4 час pi. Bl = кровь, Li = печень, He = сердце, Ki = почки, St = желудок, In = кишечник, Sp = селезенка, Mu = мышцы, Lu = легкие, Pa = поджелудочная железа, Fe = бедро и Tu = опухоль PC-3. Высокие значения в опухолях (~30% ID/г) достигаются радиофармацевтическим средством в момент 1 час и 4 час pi, которые остаются исключительно высокими (>25% ID/г) в момент 24 час pi.



Фигура 2B: Радиохроматограмма ex vivo образцов крови мышей через 5 мин после инъекции [^{99m}Tc]-NeoBOMB-2 показывает, что >88% исходного пептида остается неизменным.

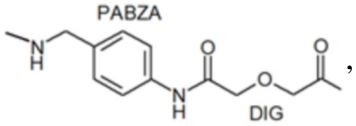
(57) Формула изобретения

1. Фармацевтическая композиция для лечения рака, экспрессирующего рецептор гастриновысвобождающего пептида (GRPR), содержащая антагонист GRPR, содержащий радиоактивную метку общей формулы: MC-S-P,

где:

M представляет собой радиоактивный метал и C представляет собой хелатирующий метал, который стабильно связывает M, или MC представляет собой Tyr- или простетическую группу, связанную с радиоактивным атомом галогена, где M представляет собой радиоактивный атом галогена;

S представляет собой



,

где PABZA обозначает п-аминобензиламин;

DIG обозначает дигликолевую кислоту и

S представляет собой разделительную группу, ковалентно связанную между C и P, где S ковалентно присоединен к N-концу P; и

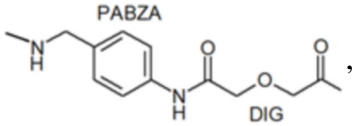
P представляет собой DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-NH-CH[CH_2-CH(CH_3)$_2$]$_2$ (SEQ ID NO: 1); и терапевтически приемлемый эксципиент.

2. Фармацевтическая композиция для обнаружения, визуализации, диагностики и/или нацеливания на рак, экспрессирующий рецептор гастриновысвобождающего пептида (GRPR), содержащая антагонист GRPR, содержащий радиоактивную метку общей формулы: MC-S-P,

где:

M представляет собой радиоактивный метал и C представляет собой хелатирующий метал, который стабильно связывает M, или MC представляет собой Tyr- или простетическую группу, связанную с радиоактивным атомом галогена, где M представляет собой радиоактивный атом галогена;

S представляет собой



,

где PABZA обозначает п-аминобензиламин;

DIG обозначает дигликолевую кислоту и

S представляет собой разделительную группу, ковалентно связанную между C и P, где S ковалентно присоединен к N-концу P; и

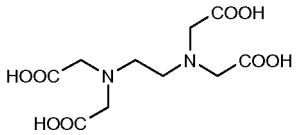
P представляет собой DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-NH-CH[CH_2-CH(CH_3)$_2$]$_2$ (SEQ ID NO: 1); и терапевтически приемлемый эксципиент.

3. Композиция по п.1 или 2, где M выбран из группы, состоящей из: ^{111}In, ^{99m}Tc, ^{94m}Tc, ^{67}Ga, ^{66}Ga, ^{68}Ga, ^{52}Fe, ^{69}Er, ^{72}As, ^{97}Ru, ^{203}Pb, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{86}Y, ^{90}Y, ^{51}Cr, ^{52m}Mn, ^{157}Gd, ^{177}Lu, ^{161}Tb, ^{169}Yb, ^{175}Yb, ^{105}Rh, ^{166}Dy, ^{166}Ho, ^{153}Sm, ^{149}Pm, ^{151}Pm, ^{172}Tm, ^{121}Sn, ^{177m}Sn, ^{213}Bi, ^{142}Pr, ^{143}Pr, ^{198}Au, ^{199}Au, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, и ^{18}F.

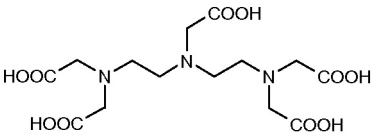
4. Композиция по п.1 или 2, где хелатирующий металлы агент C представляет собой хелатирующий металлы агент для двух- и трехвалентных металлов.

5. Композиция по п.4, где хелатирующий металлы агент для двух- и трехвалентных металлов является хелатирующим агентом DTPA, NOTA, DOTA или TETA или их производным, включая бифункциональное производное.

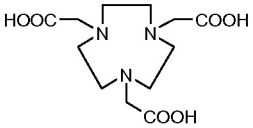
6. Композиция по п.1 или 2, где хелатирующий металлы агент C выбран из группы, состоящей из:



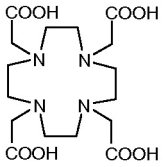
EDTA



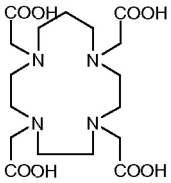
DTPA



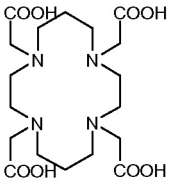
NOTA



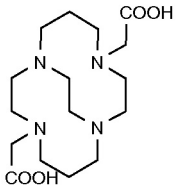
DOTA



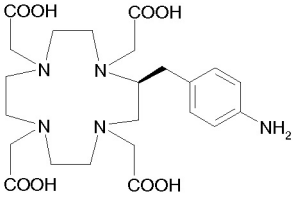
TRITA



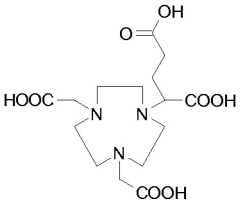
TETA



CB-TE2A



бифункциональный DOTA

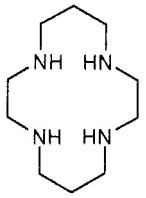


бифункциональный NOTA

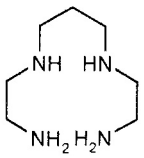
7. Композиция по п.1 или 2, где хелатирующий металлы агент C представляет собой хелатирующий металлы агент для радионуклидов технеция или рения.

8. Композиция по п.1 или 2, где C представляет собой хелатирующий металлы агент для радионуклидов технеция или рения, выбранный из группы, состоящей из ациклических тетрааминовых, цикламовых, PnAO- или тетрадентатных хелатообразующих агентов, содержащих наборы донорных атомов, выбранных из группы, состоящей из: P_2S_2-, N_2S_2- и N_3S-; производных указанных тетрадентатных хелатообразующих агентов; бифункциональных производных указанных тетрадентатных хелатообразующих агентов; хелатообразующих агентов на основе HYNIC/солигандов; и би- и тридентатных хелатообразующих агентов, которые формируют металлоорганические комплексы по трикарбонильному способу.

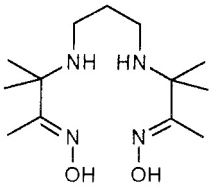
9. Композиция по п.1 или 2, где C представляет собой хелатирующий металлы агент для радионуклидов технеция или рения, выбранный из группы, состоящей из:



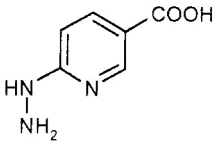
циклам



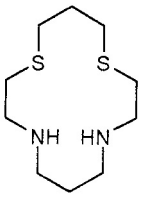
N_4



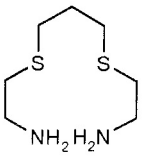
PnAO



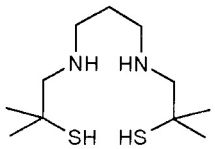
HYNIC



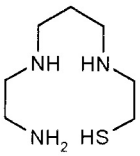
N_2S_2-циклам



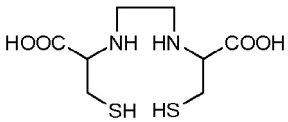
S_2N_2



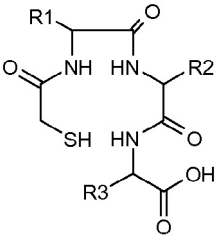
N_2S_2



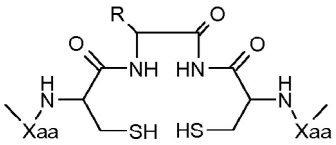
N_3S



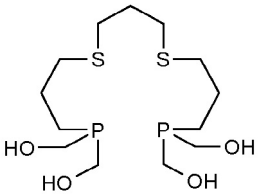
ECD



MAG_3 (R1 = R2 = R3 = H)



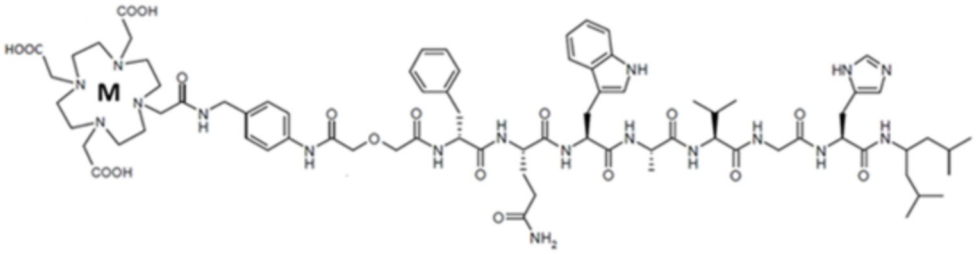
-Xaa-Cys-Xaa-Cys-Xaa-



P_2S_2

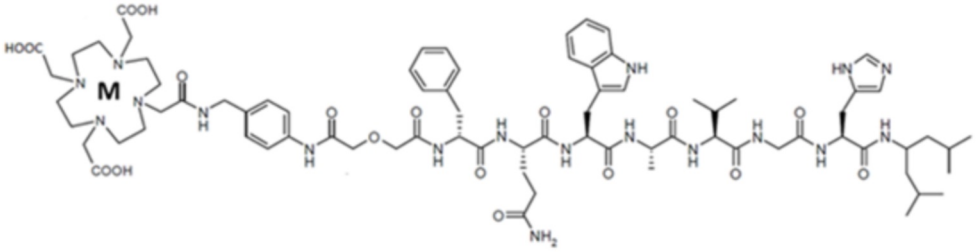
и их бифункциональных производных.

10. Фармацевтическая композиция для лечения рака, экспрессирующего рецептор гастриновысвобождающего пептида (GRPR), содержащая антагонист GRPR, содержащий радиоактивную метку, который представляет собой NeoBOMB-1 следующей формулы:



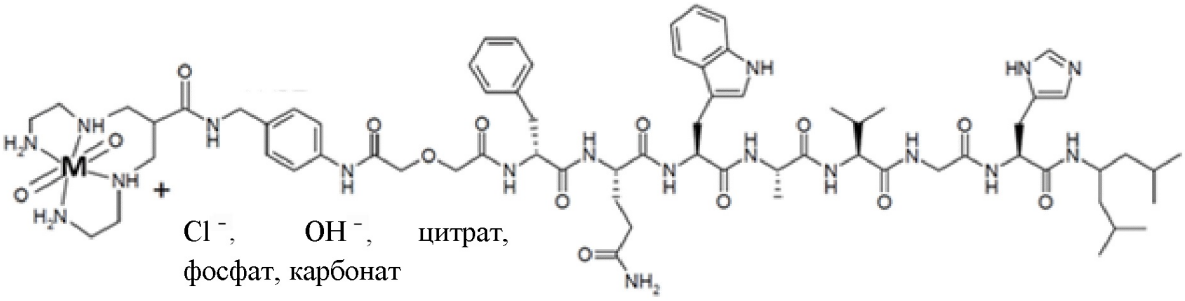
(M-DOTA-(п-аминобензиламиндигликолевая кислота)-[D-Phe^{6}, His^{12}-NH-CH[(CH_2-CH(CH_3)$_2$]$_2$,des-Leu^{13},des-Met^{14}]BB(6-14)) и терапевтически приемлемый эксципиент.

11. Фармацевтическая композиция для обнаружения, визуализации, диагностики и/или нацеливания на рак, экспрессирующий рецептор гастриновысвобождающего пептида (GRPR), содержащая антагонист GRPR, содержащий радиоактивную метку, который представляет собой NeoBOMB-1 следующей формулы:



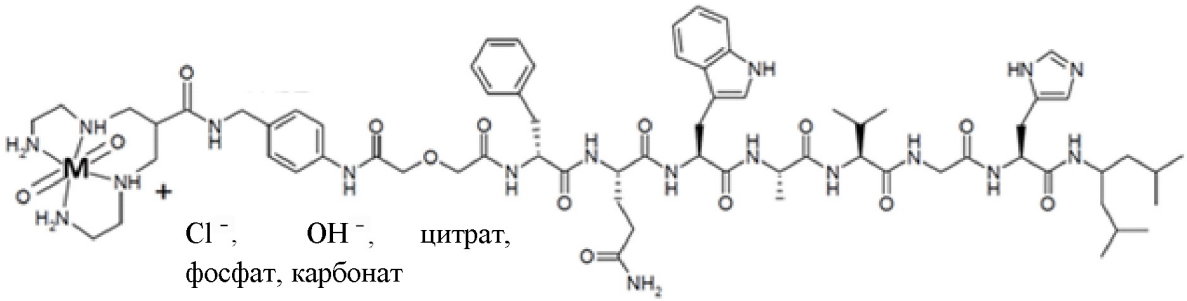
(M-DOTA-(п-аминобензиламиндигликолевая кислота)-[D-Phe^{6}, His^{12}-NH-CH[(CH_2-CH(CH_3)$_2$]$_2$,des-Leu^{13},des-Met^{14}]BB(6-14)) и терапевтически приемлемый эксципиент.

12. Фармацевтическая композиция для лечения рака, экспрессирующего рецептор гастриновысвобождающего пептида (GRPR), содержащая антагонист GRPR, содержащий радиоактивную метку, который представляет собой NeoBOMB-2 следующей формулы:



(M-N_4-(п-аминобензиламиндигликолевая кислота)-[D-Phe^{6}, His^{12}-NH-CH[(CH_2-CH(CH_3)$_2$]$_2$,des-Leu^{13},des-Met^{14}]BB(6-14)) и терапевтически приемлемый эксципиент.

13. Фармацевтическая композиция для обнаружения, визуализации, диагностики, нацеливания на рак, экспрессирующий рецептор гастриновысвобождающего пептида (GRPR), содержащая антагонист GRPR, содержащий радиоактивную метку, который представляет собой NeoBOMB-2 следующей формулы:



(M-N_4-(п-аминобензиламиндигликолевая кислота)-[D-Phe^6, His^{12}-NH-CH[(CH_2-CH(CH_3)$_2$]$_2$,des-Leu^{13},des-Met^{14}]BB(6-14)) и терапевтически приемлемый эксципиент.

14. Композиция по п.1 или 2, где M представляет собой ^{111}In, ^{177}Lu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{99m}Tc, ^{186}Re или ^{188}Re.

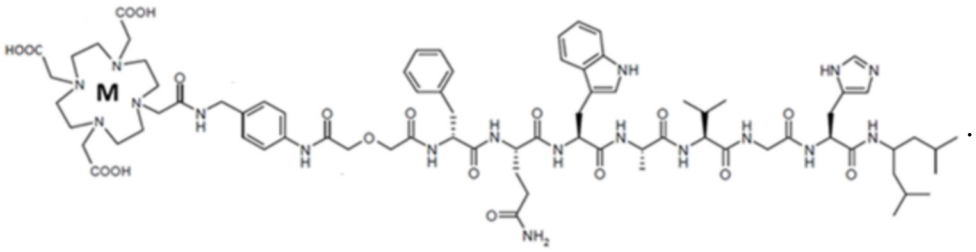
15. Композиция по п.10 или 11, где M представляет собой ^{111}In, ^{177}Lu, ^{67}Ga или ^{68}Ga.

16. Композиция по п.12 или 13, где M представляет собой ^{99m}Tc, ^{186}Re или ^{188}Re.

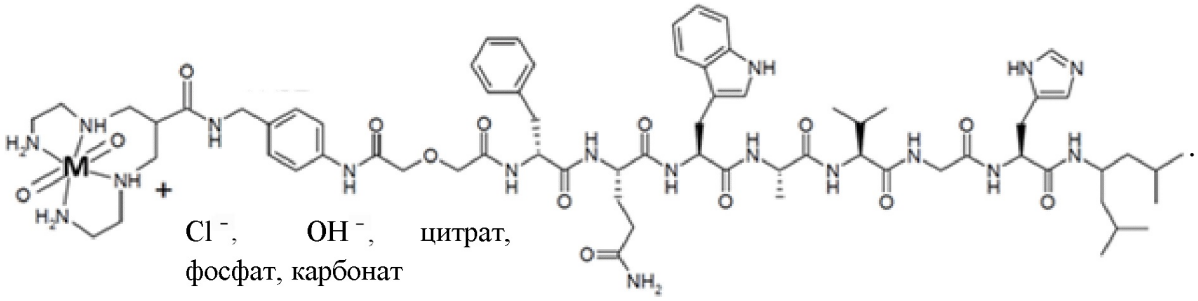
17. Способ лечения рака, экспрессирующего рецептор гастриновысвобождающего пептида (GRPR), где способ включает введение фармацевтической композиции по любому из пп.1-16 в эффективном количестве человеку или животному-субъекту.

18. Способ обнаружения, визуализации, диагностики, нацеливания на рак, экспрессирующий рецептор гастриновысвобождающего пептида (GRPR), где способ включает введение фармацевтической композиции по любому из пп.1-16 в эффективном количестве человеку или животному-субъекту.

19. Соединение следующей формулы:



20. Соединение следующей формулы:



1

1

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Advanced Accelerator Applications USA, Inc.

<120> АНТАГОНИСТЫ GRPR ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ, ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ GRPR-ПОЗИТИВНОГО ОНКОЛОГИЧЕСКОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

<130> 46639-125762
<140> PCT/US13/061712
<141> 2013-09-25
<150> US 61/705,513
<151> 2012-09-25
<160> 5
<170> PatentIn версия 3.5
<210> 1
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Синтетическая последовательность
<220>
<223> Синтетический
<220>
<221> ПРОЧИЕ ПРИЗНАКИ
<222> (1)..(1)
<223> /примечание ="DPhe"
<400> 1

Phe Gln Trp Ala Val Gly His
1 5

<210> 2
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Синтетическая последовательность
<220>
<223> Синтетический
<220>
<221> ПРОЧИЕ ПРИЗНАКИ
<222> (1)..(1)
<223> /примечание="DPhe"
<400> 2

Phe Gln Trp Ala Val Gly His
1 5

<210> 3
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Синтетическая последовательность
<220>
<223> Синтетический
<220>
<221> ПРОЧИЕ ПРИЗНАКИ
<222> (1)..(1)
<223> /примечание ="DPhe"
<400> 3

Phe Gln Trp Ala Val Gly His
1 5

<210> 4
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Синтетическая последовательность

2

<220>
<223> Синтетический
<220>
<221> ПРОЧИЕ ПРИЗНАКИ
<222> (1)..(1)
<223> /примечание="DTyr"
<400> 4

Thr Gln Trp Ala Val Gly His
1 5

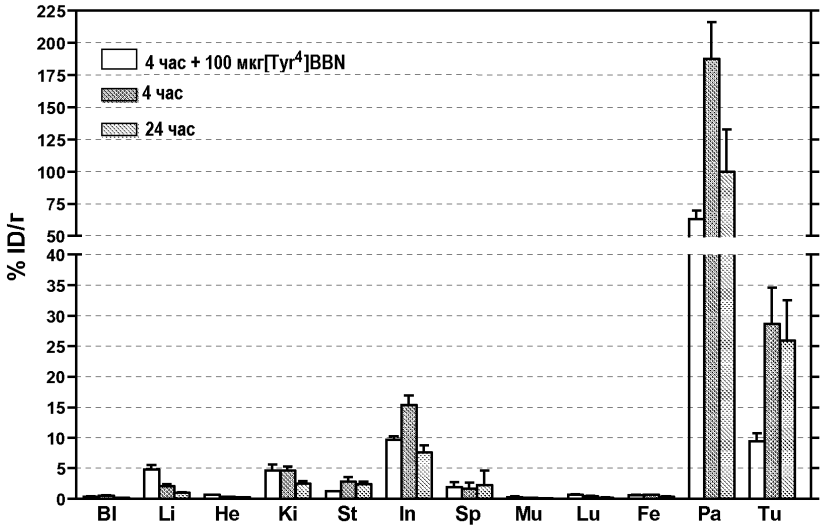
<210> 5
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Синтетическая последовательность
<220>
<223> Синтетический
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (1)..(1)
<223> /замена=" " или "Asn" или "Thr" или "Thi" или "Cpa" или "альфа-Nal" или "бета-Nal" или "Tpi" или "Tyr" или "o-I-Tyr" или "Trp" или "5-F-Phe"

<220>
<221> ПРОЧИЕ ПРИЗНАКИ
<222> (1)..(7)
<223> /примечание="Остатки варианта, приведенные в последовательности, не имеют предпочтения по отношению к остаткам в аннотациях для позиций варианта"

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (2)..(2)
<223> /замена="Asn" или "His"
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (3)..(3)
<223> /замена="Tpi"
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (4)..(4)
<223> /замена="Ser" или "Val"
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (5)..(5)
<223> /замена="Ser" или "Thr"
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (6)..(6)
<223> /замена="Sar" или "D-Ala" или "бета-Ala"
<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> (7)..(7)
<223> /замена="(3-Me)His"
<400> 5

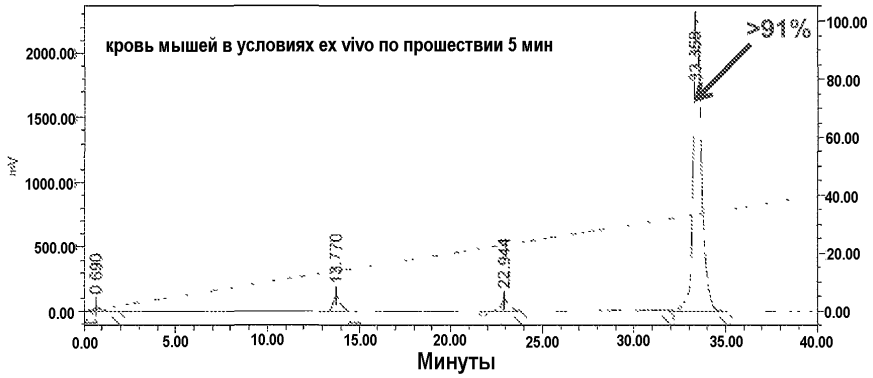
Phe Gln Trp Ala Val Gly His
1 5

3

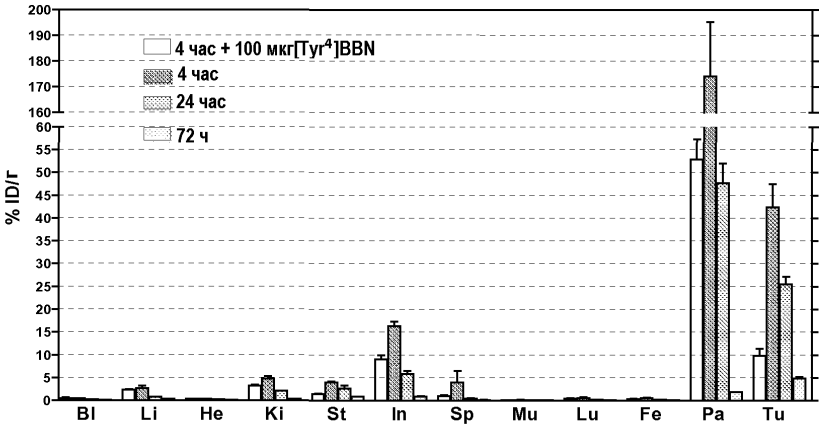

4 час + 100 мкг[Тур4]BBN
4 час
24 час
% ID/г
225
200
175
150
125
100
75
50
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Bl
Li
He
Ki
St
In
Sp
Mu
Lu
Fe
Pa
Tu

ФИГ.1А

4

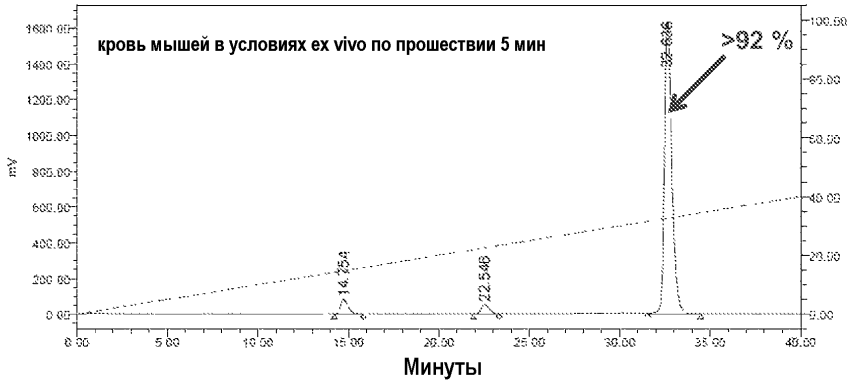

кровь мышей в условиях ex vivo по прошествии 5 мин
>91%
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
0.690
13.770
22.944
33.359
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
Минуты

ФИГ.1В


4 час + 100 мкг[Тур4]BBN
4 час
24 час
72 ч
% ID/г
200
190
180
170
160
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Bl
Li
He
Ki
St
In
Sp
Mu
Lu
Fe
Pa
Tu

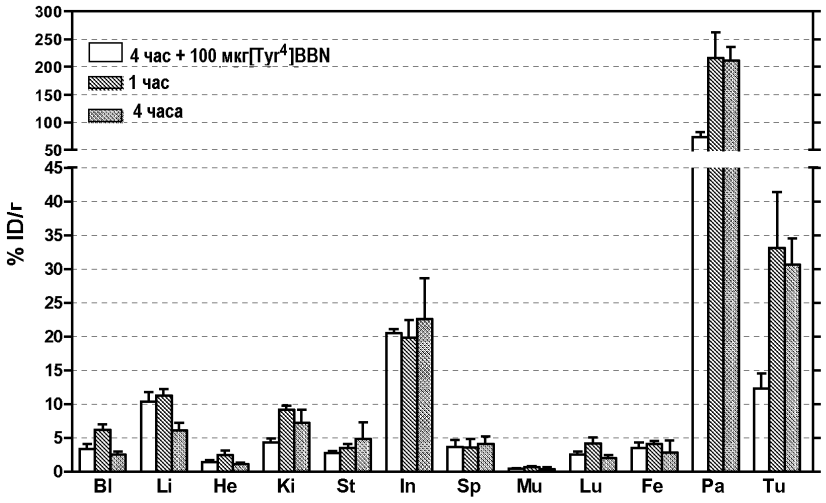
ФИГ.1С

6


кровь мышей в условиях ex vivo по прошествии 5 мин
>92 %
mV
Минуты

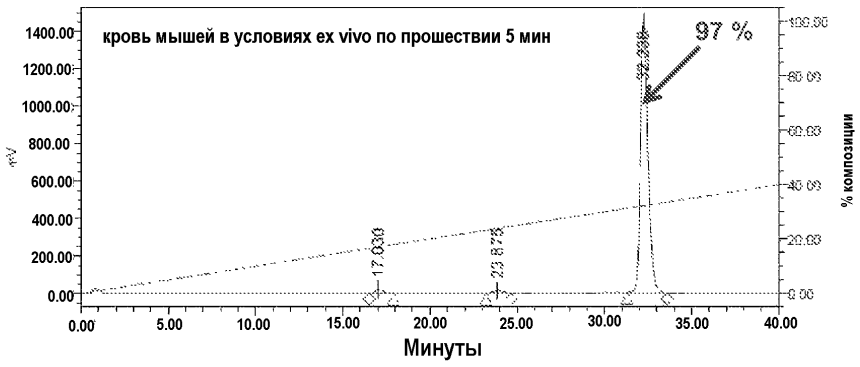
ФИГ.1D

7

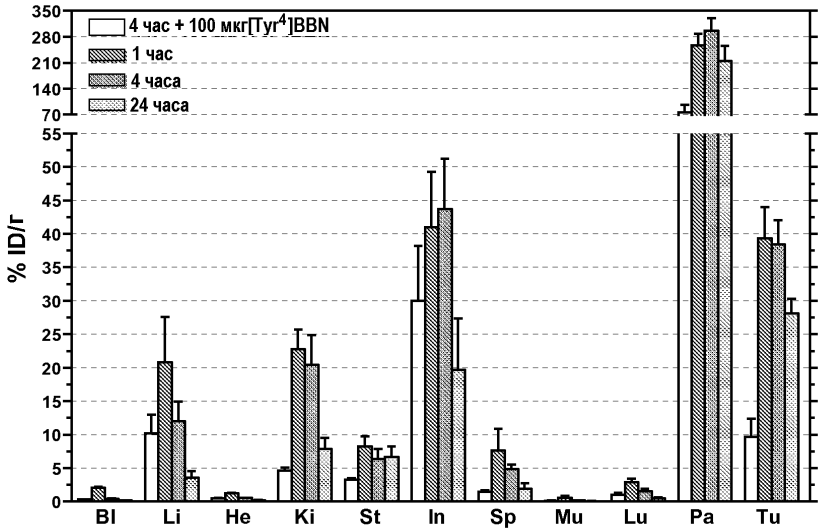

4 час + 100 мкг[Tyr4]BBN
1 час
4 часа
% ID/г
300
250
200
150
100
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Bl
Li
He
Ki
St
In
Sp
Mu
Lu
Fe
Pa
Tu

ФИГ.1E

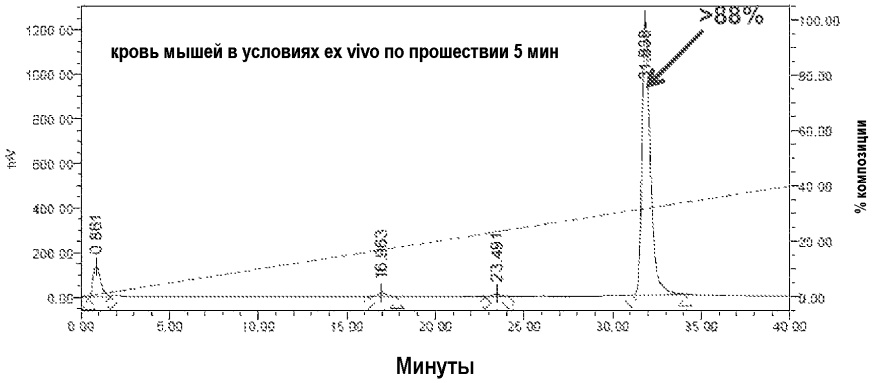
8


кровь мышей в условиях ex vivo по прошествии 5 мин
97 %
mV
1400.00
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
17.030
23.875
32.338
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
% композиции
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
Минуты

ФИГ.1F


4 час + 100 мкг[Tyr4]BBN
1 час
4 часа
24 часа
% ID/г
350
280
210
140
70
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Bl
Li
He
Ki
St
In
Sp
Mu
Lu
Pa
Tu

ФИГ.2А


кровь мышей в условиях ex vivo по прошествии 5 мин
>88%
mV
% композиции
Минуты

ФИГ.2В